

COM. USSN 10/763, 249

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 2 月 6 日 (06.02.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/010307 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12N 9/48, 15/57, 1/21, 1/19, 5/10, C12P 21/02
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/07635
- (22) 国際出願日: 2002 年 7 月 26 日 (26.07.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2001-226568 2001 年 7 月 26 日 (26.07.2001) JP
特願2001-310547 2001 年 10 月 5 日 (05.10.2001) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 味の素株式会社 (AJINOMOTO CO., INC.) [JP/JP]; 〒104-8315 東京都中央区京橋一丁目 1 5 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 外内 尚人 (TONOUCHI, Naoto) [JP/JP]; 〒210-8681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 番 1 号 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 鈴木 園子 (SUZUKI, Sonoko) [JP/JP]; 〒210-8681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 番 1 号 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 横関 健三 (YOKOZEKI, Kenzo) [JP/JP]; 〒210-8681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 番 1 号 味の素株式会社内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 酒井 宏明 (SAKAI, Hiroaki); 〒100-0013 東京都千代田区霞ヶ関三丁目 2 番 6 号 東京倶楽部ビルディング Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) Title: PEPTIDE SYNTHASE GENE, PEPTIDE SYNTHASE AND PROCESS FOR PRODUCING DIPEPTIDE

(54) 発明の名称: ペプチド生成酵素遺伝子、ペプチド生成酵素およびジペプチドの製造方法

(57) Abstract: It is intended to provide a process for industrially advantageously producing a dipeptide via a convenient pathway starting with less expensive and easily available materials. Namely, a dipeptide is produced from an L-amino acid ester and a L-amino acid by using a culture of a microorganism capable of synthesizing the dipeptide from the L-amino acid ester and the L-amino acid, or optionally processed microbial cells separated from this culture.

(57) 要約:

本発明は、安価に入手可能な出発原料を用いて、工業的に有利かつ簡便な経路でジペプチドを製造する方法を提供する。L-アミノ酸エステルとL-アミノ酸とからジペプチドを生成する能力を有する微生物の培養物、該培養物より分離した微生物菌体、または該微生物の菌体処理物を用いて、L-アミノ酸エステルおよびL-アミノ酸からジペプチドを製造する。

WO 03/010307 A1



添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(反応2) が知られており、反応1の例としては、Z-アスパラギン酸とフェニルアラニンメチルエステルからのZ-アスパルチルフェニルアラニンメチルエステルの製造方法(特開昭53-92729号公報)、(反応2)の例としてはアセチルフェニルアラニンエチルエステルとロイシンアミドからのアセチルフェニルアラニルロイシンアミドの製造方法(Biochemical J., 163, 531 (1977))が挙げられる。N無保護、C保護のカルボキシ成分を用いる方法の研究報告例は極めて少なく、N無保護、C保護のカルボキシ成分とN無保護、C保護のアミン成分を用いる置換反応(反応3)の例としては特許WO 90/01555があり、例えばアルギニンエチルエステルとロイシンアミドからのアルギニルロイシンアミドの製造方法が挙げられる。N無保護、C保護のカルボキシ成分とN無保護、C無保護のアミン成分を用いる置換反応(反応4)の例としては、特許EP 278787Aがあり、例えばチロシンエチルエステルとアラニンからのチロシルアラニンの製造方法が挙げられる。これらの方法の中で最も安価な製造方法となり得るのは、当然ながら保護基の数が最も少ない反応4の範疇に入る反応である。

しかしながら、反応4の先行例(特許EP 278787A)に使用する酵素は、カビ、植物に由来する比較的高価な carboxypeptidase 標品を用いており、また生産されるジペプチドも比較的高水度の高いアミノ酸を含むものであった。反応4において、細菌および酵母由来の酵素を用いる方法は全く知られておらず、また親水性の高いアラニルグルタミンやアラニルアスパラギンの製造方法についても全く知られていなかった。このような背景の下、これらペプチドの工業的安価な製造法の開発が望まれていた。

一方、プロリンイミノペプチダーゼは、N末端にプロリンを持つペプチドから、そのN末端プロリンを切り出す反応を触媒する酵素であり、多くの生物種においてその存在が知られている。例えば、モルモット(脳)(J. Biol. Chem., 258, 6147-6154(1983))、ラット(脳・腎)(Eur. J. Biochem., 190, 509-515(1990))等の高等動物、アンズ種子(J. Biochem., 92, 413-421(1982))等の高等植物、トルコデマ・デンテコーラ(Infect. Immun., 64, 702-708(1996))等の口腔スピロヘ

明 細 書

ペプチド生成酵素遺伝子、ペプチド生成酵素およびジペプチドの製造方法

5 技術分野

本発明は、複雑な合成方法を経ることなく、簡便かつ安価にジペプチドを製造する方法に関し、詳しくは、ペプチド生成酵素遺伝子、ペプチド生成酵素、および該酵素を用いたジペプチドの製造方法に関する。

10 背景技術

ジペプチドは、医薬品素材、機能性食品等のさまざまな分野で利用されている。例えば、L-アラニル-L-グルタミンは無血清培地の成分として有用であり、L-グルタミンに比べ安定で、水溶性も高いことから輸液成分に用いられる。

ジペプチドの製造法としては従来から化学合成法が知られているが、その製造法は必ずしも簡便なものではなかった。例えば、N-ベンジルオキシカルボニルアラニン（以下Z-アラニンと称する）と保護L-グルタミンを用いる方法（Bull. Chem. Soc. Jpn., 34, 739 (1961)、Bull. Chem. Soc. Jpn., 35, 1966 (1962)）、Z-アラニンと保護L-グルタミン酸-γ-メチルエステルを用いる方法（Bull. Chem. Soc. Jpn., 37, 200 (1964)）、Z-アラニンエステルと無保護グルタミン酸を用いる方法（特開平1-96194号公報）、2-置換-プロピオニルハロ

15 法は必ずしも簡便なものではなかった。例えば、N-ベンジルオキシカルボニルアラニン（以下Z-アラニンと称する）と保護L-グルタミンを用いる方法（Bull. Chem. Soc. Jpn., 34, 739 (1961)、Bull. Chem. Soc. Jpn., 35, 1966 (1962)）、Z-アラニンと保護L-グルタミン酸-γ-メチルエステルを用いる方法（Bull. Chem. Soc. Jpn., 37, 200 (1964)）、Z-アラニンエステルと無保護グルタミン酸を用いる方法（特開平1-96194号公報）、2-置換-プロピオニルハロ

20 イドを原料として、N-（2-置換）-プロピオニルグルタミン誘導体を中間体として合成する方法（特開平6-234715号公報）等が知られている。

しかしながら、いずれの方法においても、保護基の導入脱離、もしくは中間体の合成が必要であり、工業的に有利で十分に満足できる製造方法ではなかった。

25 酵素を用いたジペプチドの代表的製造法としては、N保護、C無保護のカルボキシ成分とN無保護、C保護のアミン成分を用いる縮合反応（反応1）、およびN保護、C保護のカルボキシ成分とN無保護、C保護のアミン成分を用いる置換反応

ータ、ペニシリウム等の糸状菌（特開平１－２１５２８８）、しいたけ等の担子菌（特開昭５８－３６３８７）、ストレプトミセス・ブリカタス(Biochem. Biophys. Res. Commun., 184, 1250-1255(1992))等の放線菌類、コリネバクテリウム・バリ
アビリス(J. Appl. Microbiol., 90, 449-456(2001))等の細菌等で、プロリンイ
5 ミノペプチダーゼの存在が知られている。

また、プロリンイミノペプチダーゼ遺伝子も、アースロバクター・ニコチアナ(FEMS Microbiol. Lett., 78, 191-197(1999))、エシェリヒア・コリ(特開平２－
１１３８８７)、フラボバクテリウム・メニンゴセプティカム(Arch. Biochem. Biophys., 336, 35-41(1996))、ハフニア・アルベイ(J. Biochem., 119,
10 468-474(1996))、ラクトバチルス・デブルキー(Microbiology, 140, 527-535(1994))、バチルス・コアギュランズ由来(J. Bacteriol., 174, 7919-1925(1994))、アエロモナス・ソブリア由来(J. Biochem., 116, 818-825(1994))、キサントモナス・キャンペストリス(特開平９－１２１８６０)、
ナイセリア・コノローヘ(Mol. Microbiol., 9, 1203-1211(1993))、プロピオニ
15 バクテリウム・フリュデンリチー(Appl. Environ. Microbiol., 64, 4736-4742(1998))、セラチア・マルセッセンス(J. Biochem., 122, 601-605(1997))、
サーモプラズマ・アシドフィラム(FEBS Lett., 398, 101-105(1996))の遺伝子の
クローニング、塩基配列が報告されている。

また最近、微生物の全ゲノム解析により、多くの生物種で、プロリンイミノペ
20 プチダーゼをコードすると推測される塩基配列が報告されている。例えば、シュ
ードモナス・アルギノーサのゲノム全塩基配列が報告され(Nature, 406, 959(2000))、その中でプロリンイミノペプチダーゼをコードすると推測される塩
基配列が見出されている。

一方、プロリンイミノペプチダーゼにより、Ｌ－プロリンあるいはDＬ－プロ
25 リンのエステルと α アミノ酸を反応させて含プロリンジペプチドを生成すること
が見出されている(特開平３－１３３９１号公報)。しかしながら、プロリンイミ
ノペプチダーゼはN末端にプロリンを持つペプチドから、そのN末端プロリンを

切り出す反応を触媒する酵素であり、この基質特異性から、プロリンエステルとアミノ酸からプロリルアミノ酸を生成させることは当然考えられることであるが、プロリンイミノペプチダーゼを用いてプロリン以外のアミノ酸エステルとアミノ酸からペプチドを合成することは全く知られていなかった。勿論、L-アラニンエチルエステル塩酸塩及びL-グルタミンからL-アラニル-L-グルタミンを合成することについてもこれまで全く知られていなかった。また、シュードモナス・プチダ ATCC12633 のプロリンイミノペプチダーゼ部分塩基配列が公開されていた (AF032970) が、その活性については検出も含め全く検討されていなかった。

10 発明の開示

本発明は、安価に入手可能な出発原料と安価に供給できる酵素源（微生物の培養物、微生物菌体、菌体処理物等）を用いて、工業的に有利かつ簡便な経路でジペプチドを製造する方法を提供することを目的とする。

本発明者らは上記目的に鑑み鋭意研究を重ねた結果、プロリンイミノペプチダーゼが、L-アミノ酸エステルとL-アミノ酸とからペプチドを生成する能力を有することを見出した。また、該酵素についてその遺伝子をクローニング・発現するとともに、精製組換え酵素を用いてペプチド生成の広い基質特異性を明らかにすることにより、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は、以下のとおりである。

20 [1] 下記 (A) または (B) に示すタンパク質。

(A) 配列表の配列番号 5 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号 5 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、L-アミノ酸エステルとL-アミノ酸とからジペプチドを生成する活性を有する

25 タンパク質。

[2] 下記 (C) または (D) に示すタンパク質。

(C) 配列表の配列番号 15 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(D) 配列表の配列番号 15 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、L-アミノ酸エステルと L-アミノ酸とからジペプチドを生成する活性を有するタンパク質。

5 〔3〕 下記 (E) または (F) に示すタンパク質。

(E) 配列表の配列番号 17 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(F) 配列表の配列番号 17 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、L-アミノ酸エステルと L-アミノ酸とからジペプチドを生成する活性を有するタンパク質。

10

〔4〕 下記 (a) または、(b) に示す DNA。

(a) 配列表の配列番号 4 に記載の塩基番号 57～1295 の塩基配列からなる DNA

(b) 配列表の配列番号 4 に記載の塩基番号 57～1295 の塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、L-アミノ酸エステルと L-アミノ酸とからジペプチドを生成する活性を有するタンパク質をコードする DNA

15

〔5〕 下記 (c) または (d) に示す DNA。

(c) 配列表の配列番号 14 に記載の塩基番号 486～1496 の塩基配列からなる DNA

20

(d) 配列表の配列番号 14 に記載の塩基番号 486～1496 の塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、L-アミノ酸エステルと L-アミノ酸とからジペプチドを生成する活性を有するタンパク質をコードする DNA

25 〔6〕 下記 (e) または (f) に示す DNA。

(e) 配列表の配列番号 16 に記載の塩基番号 311～1279 の塩基配列からなる DNA

(f) 配列表の配列番号 1 6 に記載の塩基番号 3 1 1 ~ 1 2 7 9 の塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、L-アミノ酸エステルと L-アミノ酸とからジペプチドを生成する活性を有するタンパク質をコードする DNA

- 5 〔7〕 前記ストリンジェントな条件が、 $1 \times \text{SSC}$ 及び 0.1% SDS に相当する塩濃度で 60°C で洗浄が行われる条件である、上記〔4〕から〔6〕のいずれか一項に記載の DNA。

〔8〕 上記〔4〕から〔7〕のいずれか一項に記載の DNA が組み込まれた組換え DNA。

- 10 〔9〕 上記〔4〕から〔7〕のいずれか一項に記載の DNA がコードするタンパク質を発現可能に導入された形質転換細胞。

〔10〕 上記〔9〕に記載の形質転換細胞を培地で培養し、培地中および／または形質転換細胞中に、L-アミノ酸エステルと L-アミノ酸とからジペプチドを生成する活性を有するタンパク質を蓄積させることを特徴とする、ジペプチド生成酵素の製造方法。

15

〔11〕 上記〔9〕に記載の形質転換細胞が生成する、L-アミノ酸エステルと L-アミノ酸とからジペプチドを生成する活性を有するタンパク質を用いて、L-アミノ酸エステルと L-アミノ酸とからジペプチドを製造することを特徴とする、ジペプチドの製造方法。

- 20 〔12〕 前記 L-アミノ酸エステルが、L-アラニンエステル、グリシンエステル、L-バリンエステル、L-イソロイシンエステル、L-メチオニンエステル、L-フェニルアラニンエステル、L-セリンエステル、L-スレオニンエステル、L-グルタミンエステル、L-チロシンエステル、L-アルギニンエステル、L-アスパラギン酸- α -エステル、L-アスパラギン酸- β -エステル、L-ロイシンエステル、L-アスパラギン酸エステル、L-リジンエステル、L-アスパラギン酸- α 、 β -ジメチルエステル、L-グルタミン- γ -エステルからなる群より選ばれる 1 種または 2 種以上であることを特徴とする、上記〔11〕に
- 25

記載のジペプチドの製造法。

〔13〕 前記L-アミノ酸が、L-グルタミン、L-アスパラギン、グリシン、L-アラニン、L-ロイシン、L-メチオニン、L-プロリン、L-フェニルアラニン、L-トリプトファン、L-セリン、L-スレオニン、L-チロシン、L-リジン、L-アルギニン、L-ヒスチジンおよびL-グルタミン酸からなる群より選ばれる1種または2種以上であることを特徴とする、上記〔11〕または〔12〕に記載のジペプチドの製造法。

〔14〕 プロリンイミノペプチダーゼ活性を有するたんぱく質を、L-アミノ酸エステルおよびL-アミノ酸に作用させ、ジペプチドを合成することを特徴とするジペプチドの製造法。

〔15〕 前記プロリンイミノペプチダーゼ活性を有するタンパク質が、コリネバクテリウム属、シュードモナス属、バチルス属のいずれかに属する微生物に由来することを特徴とする、上記〔14〕に記載のジペプチドの製造法。

〔16〕 前記プロリンイミノペプチダーゼ活性を有するタンパク質が、コリネバクテリウム、グルタミカム、シュードモナス、プチダ、バチルス、コアギュランスのいずれかに由来することを特徴とする、前記〔14〕に記載のジペプチドの製造法。

〔17〕 前記アミノ酸エステルが、L-アラニンエステル、グリシンエステル、L-バリンエステル、L-イソロイシンエステル、L-メチオニンエステル、L-フェニルアラニンエステル、L-セリンエステル、L-スレオニンエステル、L-グルタミンエステル、L-チロシンエステル、L-アルギニンエステル、L-アスパラギン酸- α -エステル、L-アスパラギン酸- β -エステル、L-ロイシンエステル、L-アスパラギンエステル、L-リジンエステル、L-アスパラギン酸- α 、 β -ジメチルエステル、L-グルタミン- γ -エステルからなる群より選ばれる1種または2種以上であることを特徴とする、上記〔14〕から〔16〕のいずれか一項に記載のペプチドの製造法。

〔18〕 前記L-アミノ酸が、L-グルタミン、L-アスパラギン、グリシン、

5 L-アラニン、L-ロイシン、L-メチオニン、L-プロリン、L-フェニルアラニン、L-トリプトファン、L-セリン、L-スレオニン、L-チロシン、L-リジン、L-アルギニン、L-ヒスチジンおよびL-グルタミン酸からなる群より選ばれる1種または2種以上であることを特徴とする、上記〔14〕から〔17〕のいずれか一項に記載のペプチドの製造法。

10 〔19〕 コリネバクテリウム属、シュードモナス属またはバチルス属に属し、アミノ酸エステルとアミノ酸とからジペプチドを生成する能力を有する微生物の培養物、該培養物より分離した微生物菌体、該微生物の菌体処理物を用いて、アミノ酸エステルとアミノ酸とからジペプチドを製造することを特徴とするジペプチドの製造方法。

15 〔20〕 前記アミノ酸エステルが、L-アラニンエステル、グリシンエステル、L-バリンエステル、L-イソロイシンエステル、L-メチオニンエステル、L-フェニルアラニンエステル、L-セリンエステル、L-スレオニンエステル、L-グルタミンエステル、L-チロシンエステル、L-アルギニンエステル、L-アスパラギン酸- α -エステル、L-アスパラギン酸- β -エステル、L-ロイシンエステル、L-アスパラギンエステル、L-リジンエステル、L-アスパラギン酸- α 、 β -ジメチルエステル、L-グルタミン- γ -エステルからなる群より選ばれる1種または2種以上であることを特徴とする、上記〔19〕に記載のペプチドの製造法。

20 〔21〕 前記L-アミノ酸が、L-グルタミン、L-アスパラギン、グリシン、L-アラニン、L-ロイシン、L-メチオニン、L-プロリン、L-フェニルアラニン、L-トリプトファン、L-セリン、L-スレオニン、L-チロシン、L-リジン、L-アルギニン、L-ヒスチジンおよびL-グルタミン酸からなる群より選ばれる1種または2種以上であることを特徴とする、上記〔19〕に記載
25 のペプチドの製造法。

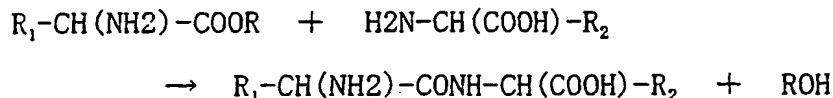
第1図は、阻害剤を添加したときのジペプチド合成活性を示した図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明は、L-アミノ酸エステルとL-アミノ酸とからジペプチドを生成する
5 活性を有する新規なタンパク質、これをコードするDNAを提供し、さらにこれらを利用したジペプチドの製造方法を提供するものである。本発明のジペプチドの製造方法における反応は下記反応式のように表される。下記化学式に例示されるように、本明細書において「ジペプチド」とは、ペプチド結合を1つ有するペプチドポリマーのことをいう。

10

(化学式1)



(Rは置換または無置換の炭化水素鎖、R₁はアミノ酸エステルの側鎖、R₂はア
15 ミノ酸の側鎖を表す)

アミノ酸エステルは、安価に入手可能な化合物である。アミノ酸エステルと無
保護アミノ酸を出発原料として、細菌、酵母などを酵素源として水溶液中で反応
せしめる本発明の方法は、従来にはない新しいジペプチドの製造方法であり、医
薬品素材、機能性食品として有用なジペプチドをより安価に提供することを可能
20 とするものである。

以下、本発明について、

[I] L-アミノ酸エステルとL-アミノ酸とからジペプチドを生成する能力を有
する微生物

[II] ペプチド生成活性を有するタンパク質をコードするDNAの単離等

25 [III] ペプチド生成酵素の性質

[IV] ジペプチドの製造方法

の順に詳細に説明する。

[I] L-アミノ酸エステルとL-アミノ酸とからジペプチドを生成する能力を有する微生物

本発明に使用する微生物としては、L-アミノ酸エステルとL-アミノ酸とからジペプチドを生成する能力を有する微生物を特に限定なく使用することができる。L-アミノ酸エステルとL-アミノ酸とからジペプチドを生成する能力を有する微生物としては、バチルス属、コリネバクテリウム属、シュードモナス属に属する微生物などを挙げるができるが、具体的には以下のものを例示することができる。

バチルス ズブチリス ATCC 6633

10 (*Bacillus subtilis*)

バチルス コアギュランス EK01 (J. Bacteriol. 174, 7919-7925(1992))

(*Bacillus coagulans*)

コリネバクテリウム グルタミカム ATCC 13286

(*Corynebacterium glutamicum*)

15 シュードモナス プチダ AJ-2402 FERM BP-8101

(*Pseudomonas putida*)

シュードモナス プチダ ATCC12633

(*Pseudomonas putida*)

シュードモナス プチダ AJ2048 FERM BP-8123

20 (*Pseudomonas putida*)

上記菌株のうち、ATCC 番号が記載されているものは、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (P. O. Box 1549 Manassas, VA 20110) に寄託されており、各番号を参照して分譲を受けることができる。

上記菌株のうち、FERM 番号が記載されているものは、独立行政法人産業技術総合研究所特許微生物寄託センター (〒305-8566 茨城県つくば市東1-1-1 中央第6) に寄託され、受託番号が付与された微生物である。シュードモナス プチダ AJ-2402 株は、2001年10月1日に独立行政法人産業技術総合研究所特

許微生物寄託センターに寄託され、AJ-2402 は FERM P-18544 の受託番号が付与され、さらに 2002 年 7 月 1 日に国際寄託へ移管され、受託番号 FERM BP-8101 が付与されている。尚、FERM BP-8101 (AJ-2402) は、以下の分類実験により、上述のシュードモナス プチダであることが同定された。また、シュードモナス プチダ AJ2048 株は、2002 年 7 月 22 日に独立行政法人産業技術総合研究所特許微生物寄託センターに寄託され、FERM BP-8123 の受託番号が付与されている。

シュードモナス プチダ FERM BP-8101 株は、桿菌 ($0.7 \sim 0.8 \times 1.5 \sim 2.0 \mu\text{m}$)、グラム陰性、孢子形成なし、運動性あり、コロニー形態は円形、全縁滑らか、凸状、光沢あり、クリーム色、30℃で生育、カタラーゼ陽性、オキシダーゼ陽性、OF テスト (グルコース) 陰性の性質より、運動性を有する無孢子桿菌であり、シュードモナスに属する細菌と同定された。更に、硝酸塩還元陰性、インドール産生陰性、グルコースからの産生陰性、アルギニンジヒドロラーゼ陽性、ウレアーゼ陰性、エスクリン加水分解陰性、ゼラチン加水分解陰性、 β -ガラクトシダーゼ陰性、グルコース資化陽性、L-アラビノース資化陰性、D-マンノース資化陽性、D-マンニトール資化陽性、N-アセチル-D-グルコサミン資化陰性、マルトース資化陰性、グルコン酸カリウム資化陽性、n-カプリン酸陽性、アジピン酸資化陰性、d,l-リンゴ酸資化陽性、クエン酸ナトリウム資化陽性、酢酸フェニル資化陽性、オキシダーゼ陽性、King's B 寒天培地での蛍光色素生産陽性、ショ糖からのレバン産生陽性、ソルビトールの資化微弱という生理学的性質よりシュードモナス プチダ (*Pseudomonas putida*) と同定された。

これらの微生物としては、野生株または変異株のいずれを用いてもよいし、また、細胞融合もしくは遺伝子操作などの遺伝学的手法により誘導される組み換え株等も用いることができる。

このような微生物の菌体を得るには、当該微生物を適当な培地で培養増殖せしめるとよい。このための培地はその微生物が増殖し得るものであれば特に制限はなく、通常炭素源、窒素源、リン源、硫黄源、無機イオン、更に必要に応じ有機栄養源を含む通常の培地でよい。

例えば、炭素源としては上記微生物が利用可能であればいずれも使用でき、具体的には、グルコース、フラクトース、マルトース、アミロース等の糖類、ソルビトール、エタノール、グリセロール等のアルコール類、フマル酸、クエン酸、酢酸、プロピオン酸などの有機酸類及びこれらの塩類、パラフィンなどの炭水化物類あるいはこれらの混合物などを使用することができる。

窒素源としては、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウムなどの無機塩のアンモニウム塩、フマル酸アンモニウム、クエン酸アンモニウムなどの有機酸のアンモニウム塩、硝酸ナトリウム、硝酸カリウムなどの硝酸塩、ペプトン、酵母エキス、肉エキス、コーンステイープリカーなどの有機窒素化合物あるいはこれらの混合物を使用することができる。

他に無機塩類、微量金属塩、ビタミン類等、通常の培地に用いられる栄養源を適宜混合して用いることができる。

培養条件にも格別の制限はなく、例えば、好氣的条件下にてpH 5～8、温度15～40℃の範囲でpHおよび温度を適当に制限しつつ12～48時間程度培養を行えばよい。

〔II〕 ペプチド合成活性を有するタンパク質をコードするDNAの単離等

〔II-1〕 DNAの単離

本発明者らは上記の微生物から、L-アミノ酸エステルとL-アミノ酸とからジペプチドを合成する活性を有するタンパク質をコードする本発明のDNAを単離し、配列を特定した。配列表の配列番号4に記載の塩基番号57～1295の塩基配列からなるDNAは、コリネバクテリウム グルタミカム ATCC13286株から単離された。また、配列表の配列番号14に記載の塩基番号486～1496の塩基配列からなるDNAは、シュードモナス プチダ ATCC12633株から単離された。さらに、配列表の配列番号16に記載の塩基番号311～1279の塩基配列からなるDNAは、シュードモナス プチダ FERM BP-8123株から単離された。なお、本明細書において「配列番号4に記載の塩基配列」、「配列番号14に記載の塩基配列」、「配列番号16に記載の塩基配列」とは、特に断らない限りC

D S 部分を指す。

DNAを単離する一例を示すと、はじめに、精製されたペプチド生成酵素のアミノ酸配列を決定する。エドマン法 (Edman, P., Acta Chem. Scand. 4, 227 (1950)) を用いてアミノ酸配列を決定することができる。また Applied Biosystems 社製の
5 シークエンサーを用いてアミノ酸配列を決定することができる。精製されたペプチド生成酵素についてのN末端、あるいは、リジルエンドペプチダーゼ等の処理により得られたペプチドの約10から30残基のアミノ酸配列を決定し、明らかとなったアミノ酸配列に基づいて、これをコードするDNAの塩基配列を演繹できる。DNAの塩基配列を演繹するには、ユニバーサルコドンを採用する。

10 演繹された塩基配列に基づいて、30塩基対程度のDNA分子を合成する。該DNA分子を合成する方法は Tetrahedron Letters, 22, 1859 (1981)に開示されている。また、Applied Biosystems 社製のシンセサイザーを用いて該DNA分子を合成できる。該DNA分子をプライマーとして用いて、PCR法で染色体DNAからペプチド生成酵素をコードするDNAを増幅することができる。ただし、
15 PCR法を用いて増幅されるDNAは、ペプチド生成酵素をコードするDNA全長を含んでいないので、PCR法を用いて増幅されるDNAをプローブとして用いて、ペプチド生成酵素をコードするDNA全長をコリネバクテリウム グルタミカム、シュードモナス プチダ、バチルス スブチリスなどの各菌株の染色体遺伝子ライブラリーから単離する。

20 あるいは、遺伝子の塩基配列の一部が既知である場合には、その既知配列を有するDNAをプローブとして用いて、ペプチド生成酵素をコードするDNA全長を染色体遺伝子ライブラリーから単離することができる。

さらに、遺伝子の塩基配列が既知配列と相同性を有する場合には、その既知配列を有するDNAをプローブとして用いて、ペプチド生成酵素をコードするDNA
25 A全長を染色体遺伝子ライブラリーから単離することができる。

PCR法の操作については、White, T. J. et al., Trends Genet. 5, 185 (1989)等に記載されている。染色体DNAを調製する方法、さらにDNA分子をプロー

ブとして用いて、遺伝子ライブラリーから目的とするDNA分子を単離する方法については、Molecular Cloning, 2nd edition, Cold Spring Harbor press (1989) 等に記載されている。

単離されたペプチド生成酵素をコードするDNAの塩基配列を決定する方法は、
5 A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley & Sons, Inc. (1985)に
記載されている。また、Applied Biosystems 社製のDNAシーケンサーを用い
て、塩基配列を決定することができる。このようにしてコリネバクテリウム グ
ルタミカムATCC13286株、シュードモナス プチダATCC12633
株、シュードモナス プチダFERM BP-8123株から単離された、ペプチド生成酵素
10 をコードするDNAを、それぞれ配列表配列番号4、14、16に示す。

本発明で用い得るDNAは、配列表配列番号4、14、16で特定されるDN
Aのみではない。例えば、コリネバクテリウム グルタミカムATCC1328
6株から単離された配列表配列番号4のDNAについて以下説明すると、コリネ
バクテリウム グルタミカムATCC13286株の染色体DNAから単離され
15 たペプチド生成酵素をコードするDNAに人工的に変異を加えたDNAであって
も、ペプチド生成酵素をコードする場合には、本発明のDNAである。人工的に
変異を加える方法として頻繁に用いられるものとして、Method. in Enzymol., 154
(1987)に記載されている部位特異的変異導入法がある。

また、配列表配列番号4に記載の塩基配列と相補的な塩基配列を有するポリヌ
20 クレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズする塩基配列を有し、ペ
プチド生成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAも本発明で用いるこ
とができるDNAである。

さらに、配列表の配列番号4に記載のCDSからなるDNAに基づいて調製さ
れるプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、ペプチド
25 合成活性を有するタンパク質をコードするDNAを単離することによっても、本
発明のDNAと実質的に同一のDNAが得られる。プローブは、例えば配列番号
4に記載の塩基配列に基づいて定法により作製することができる。また、プロー

ブを用いてこれとハイブリダイズするDNAをつり上げ、目的とするDNAを単離する方法も、定法に従って行えばよい。例えば、DNAプローブはプラスミドやファージベクターにクローニングされた塩基配列を増幅し、プローブとして用いたい塩基配列を制限酵素により切り出し、抽出して調製することができる。切り出す箇所は、目的とするDNAに応じて調節することができる。

ここで「ストリンジントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高いDNA同士、例えば50%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60℃、1×SSC、0.1%SDS、このましくは、60℃、0.1×SSC、0.1%SDS、さらに好ましくは65℃、0.1×SSC、0.1%SDSに相当する塩濃度でハイブリダイズする条件があげられる。ペプチド生成酵素の活性については既に上記にて説明したとおりである。ただし、配列表の配列番号4に記載の塩基配列と相補的な塩基配列とストリンジントな条件でハイブリダイズする塩基配列の場合には、50℃、pH8の条件下で配列表の配列番号4に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質の10%以上、より好ましくは50%以上の酵素活性を保持していることが望ましい。

さらに、配列表の配列番号4に記載のDNAがコードするペプチド生成酵素と実質的に同一のタンパク質も本発明で用いることができる。したがって、「配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列を有し、かつ、L-アミノ酸エステルとL-アミノ酸からジペプチドを生成する反応を触媒するペプチド生成酵素活性を有するタンパク質」をコードするDNAも本発明において用いることができる。ここで「数個」とは、アミノ酸残基のタンパク質の立体構造や、ペプチド生成酵素活性を大きく損なわない範囲のものであり、具体的には、2～50個、

好ましくは2～30個、さらに好ましくは2～10個である。また、ペプチド生成酵素の活性については、既に説明した通りである。ただし、配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列において1または数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加または逆位を含むアミノ酸配列の場合には、50℃、pH8の条件下で

5 配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質の10%以上、より好ましくは50%以上の酵素活性を保持していることが望ましい。

上記のように、本発明のDNAとして、コリネバクテリウム グルタミカム ATCC 13286株から単離したDNA、シュードモナス プチダ ATCC 12633株から単離したDNA、シュードモナス プチダ FERM BP-8123株から単離

10 したDNAなどのほか、これらと実質的に同一のDNAも提供される。すなわち、本発明が提供するDNAとしては次のようなものが挙げられる。

(i) 配列表の配列番号4、14または16に記載のCDSからなるDNA。

(ii) 配列表の配列番号4、14または16に記載のCDSと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ

15 L-アミノ酸エステルとL-アミノ酸からジペプチドを生成する反応を触媒するペプチド生成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNA。

(iv) 配列表の配列番号5、15または17に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNA。

(v) 配列表の配列番号5、15または17に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列を有し、かつ、L-アミノ酸エステルとL-アミノ酸からジペプチドを生成する反応を触媒するペプチド生成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNA。

20

〔II-2〕形質転換体の作製

次に、ペプチド生成酵素活性を有するタンパク質を発現する形質転換体の作製

25 について説明する。組換えDNA技術を利用して酵素、生理活性物質等の有用タンパク質を製造する例は数多く知られており、組換えDNA技術を用いることで、天然に微量に存在する有用タンパク質を大量生産できる。

本発明の方法で用いることができる形質転換体としては、例えば下記（AA）、（BB）または（CC）などのタンパク質を発現することができる形質転換体が好適なものとして挙げられる。

5 （AA）配列表の配列番号 5、15 または 17 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

（BB）配列表の配列番号 5、15 または 17 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列を有し、かつ、L-アミノ酸エステルと L-アミノ酸からジペプチドを生成する反応を触媒するペプチド生成活性を有するタンパク質。

10 （CC）配列表の配列番号 4、16 または 18 の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドまたは配列番号 4、16 または 18 の塩基配列に基づいて調製されるプローブとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ L-アミノ酸エステルと L-アミノ酸からジペプチドを生成する反応を触媒するペプチド生成酵素活性を有するタンパク質をコードする DNA でコードされるタンパク質。
15

上記（AA）～（CC）のペプチド生成活性を有するタンパク質を発現する形質転換体を作製するためには、上記〔II-1〕の欄に示した（i）、（ii）、（iii）、（iv）または（v）の DNA を宿主細胞に導入すればよい。すなわち、（i）、（ii）、（iii）、（iv）または（v）の DNA を宿主細胞で発現可能な組換え DNA、具体的には発現ベクターなどに組み込み、これを宿主細胞に導入する。
20

また、上記（BB）に示されるような変異は、例えば部位特異的変異法によって、本酵素遺伝子の特定の部位のアミノ酸が置換、欠失、挿入、付加されるように塩基配列を改変することによって得られる。また、上記のような改変された DNA は、従来知られている突然変異処理によっても取得され得る。突然変異処理
25 としては、本酵素をコードする DNA をヒドロキシルアミン等でインビトロ処理する方法、及び本酵素をコードする DNA を保持するエシェリヒア属細菌を、紫外線照射または N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン（NTG）もしくは

は亜硝酸等の通常人工突然変異に用いられている変異剤によって処理する方法などが挙げられる。

タンパク質を組換えDNA技術を用いて大量生産する場合、該タンパク質を生産する形質転換体内で該タンパク質が会合し、タンパク質の封入体 (inclusion body) を形成させる形態も好ましい一実施形態として挙げられる。この発現生産方法の利点は、目的のタンパク質を菌体内に存在するプロテアーゼによる消化から保護する点および目的のタンパク質を菌体破砕に続く遠心分離操作によって簡単に精製できる点等である。

このようにして得られるタンパク質封入体は、タンパク質変性剤により可溶化され、主にその変性剤を除去することによる活性再生操作を経た後、正しく折り畳まれた生理的に活性なタンパク質に変換される。例えば、ヒトインターロイキン-2の活性再生（特開昭61-257931号公報）等多くの例がある。

タンパク質封入体から活性型タンパク質を得るためには、可溶化・活性再生等の一連の操作が必要であり、直接活性型タンパク質を生産する場合よりも操作が複雑になる。しかし、菌体の生育に影響を及ぼすようなタンパク質を菌体内で大量に生産させる場合は、不活性なタンパク質封入体として菌体内に蓄積させることにより、その影響を抑えることができる。

目的タンパク質を封入体として大量生産させる方法として、強力なプロモータの制御下、目的のタンパク質を単独で発現させる方法の他、大量発現することが知られているタンパク質との融合タンパク質として発現させる方法がある。

さらに、融合タンパク質として発現させた後に、目的のタンパク質を切り出すため、制限プロテアーゼの認識配列を適当な位置に配しておくことも有効である。

タンパク質を組換えDNA技術を用いて大量生産する場合、形質転換される宿主細胞としては、細菌細胞、放線菌細胞、酵母細胞、カビ細胞、植物細胞、動物細胞等を用いることができるが、一般に大腸菌などの腸内細菌、好ましくは大腸菌（*Escherichia coli*）が用いられる。大腸菌などの腸内細菌を用いてタンパクを大量生産する技術について数多くの知見があるためであ

る。以下、形質転換された大腸菌を用いてペプチド生成酵素を製造する方法の一形態を説明する。

ペプチド生成酵素をコードするDNAを発現させるプロモータとしては、通常大腸菌における異種タンパク質生産に用いられるプロモータを使用することができ、例えば、T7プロモータ、lacプロモータ、trpプロモータ、trcプロモータ、tacプロモータ、ラムダファージのP_Rプロモータ、P_Lプロモータ等の強力なプロモータが挙げられる。

ペプチド生成酵素を融合タンパク質封入体として生産させるためには、ペプチド生成酵素遺伝子上流あるいは下流に、他のタンパク質、好ましくは親水性であるペプチドをコードする遺伝子を連結して、融合タンパク質遺伝子とする。このような他のタンパク質をコードする遺伝子としては、融合タンパク質の蓄積量を増加させ、変性・再生工程後に融合タンパク質の溶解性を高めるものであればよく、例えば、T7 gene 10、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、デヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、インターフェロン γ 遺伝子、インターロイキン-2遺伝子、プロキモシン遺伝子等が候補として挙げられる。

これらの遺伝子とペプチド生成酵素をコードする遺伝子とを連結する際には、コドンの読み取りフレームが一致するようにする。適当な制限酵素部位で連結するか、あるいは適当な配列の合成DNAを利用すればよい。

また、生産量を増大させるためには、融合タンパク質遺伝子の下流に転写終結配列であるターミネーターを連結することが好ましい場合がある。このターミネータとしては、T7ターミネータ、fdファージターミネータ、T4ターミネータ、テトラサイクリン耐性遺伝子のターミネータ、大腸菌trpA遺伝子のターミネータ等が挙げられる。

ペプチド生成酵素またはペプチド生成酵素と他のタンパク質との融合タンパク質をコードする遺伝子が大腸菌に導入するためのベクターとしては、いわゆるマルチコピー型のものが好ましく、ColE1由来の複製開始点を有するプラスミド、例えばpUC系のプラスミドやpBR322系のプラスミドあるいはその誘

導体が挙げられる。ここで、「誘導体」とは、塩基の置換、欠失、挿入、付加または逆位などによってプラスミドに改変を施したものを意味する。なお、ここでいう改変とは、変異剤やUV照射などによる変異処理、あるいは自然変異などによる改変をも含む。より具体的には、ベクターとしては、例えば、pUC19、pUC18、pBR322、pHSG299、pHSG298、pHSG399、pHSG398、RSF1010、pMW119、pMW118、pMW219、pMW218等を用いることができる。他にもファージDNA、トランスポゾンDNAのベクターも利用できる。

また、形質転換体を選別するために、該ベクターがアンピシリン耐性遺伝子等のマーカーを有することが好ましい。このようなプラスミドとして、強力なプロモーターを持つ発現ベクターが市販されている（pUC系（宝酒造（株）製）、pPROK系（クローンテック製）、pKK233-2（クローンテック製）ほか）。

プロモータ、ペプチド生成酵素またはペプチド生成酵素と他のタンパク質との融合タンパク質をコードする遺伝子、場合によってはターミネータの順に連結したDNA断片と、ベクターDNAとを連結して組換えDNAを得る。

該組換えDNAを用いて大腸菌を形質転換し、この大腸菌を培養すると、ペプチド生成酵素またはペプチド生成酵素と他のタンパク質との融合タンパク質が発現生産される。形質転換される宿主は、異種遺伝子の発現に通常用いられる株を使用することができるが、例えばエシェリヒア コリ JM109株が好ましい。

形質転換を行う方法、および形質転換体を選別する方法は Molecular Cloning, 2nd edition, Cold Spring Harbor press (1989)等に記載されている。

融合タンパク質として発現させた場合、血液凝固因子Xa、カリクレインなどの、ペプチド生成酵素内に存在しない配列を認識配列とする制限プロテアーゼを用いてペプチド生成酵素を切り出せるようにしてもよい。

生産培地としては、M9-カザミノ酸培地、LB培地など、大腸菌を培養するために通常用いる培地を用いてもよい。また、培養条件、生産誘導条件は、用いたベクターのマーカー、プロモータ、宿主菌等の種類に応じて適宜選択する。

ペプチド生成酵素またはペプチド生成酵素と他のタンパク質との融合タンパク質を回収するには、以下の方法などがある。ペプチド生成酵素あるいはその融合タンパク質が菌体内に可溶化されていれば、菌体を回収した後、菌体を破砕あるいは溶菌させ、粗酵素液として使用できる。さらに、必要に応じて、通常の沈澱、
5 濾過、カラムクロマトグラフィー等の手法によりペプチド生成酵素あるいはその融合タンパク質を精製して用いることも可能である。この場合、ペプチド生成酵素あるいは融合タンパク質の抗体を利用した精製法も利用できる。

タンパク質封入体が形成される場合には、変性剤でこれを可溶化する。菌体タンパク質とともに可溶化してもよいが、以降の精製操作を考慮すると、封入体を
10 取り出して、これを可溶化するのが好ましい。封入体を菌体から回収するには、従来公知の方法で行えばよい。例えば、菌体を破壊し、遠心分離操作等によって封入体を回収する。タンパク質封入体を可溶化させる変性剤としては、グアニジン塩酸（例えば、6 M、pH 5～8）や尿素（例えば8 M）などが挙げられる。

これらの変性剤を透析等により除くと、活性を有するタンパク質として再生さ
15 れる。透析に用いる透析溶液としては、トリス塩酸緩衝液やリン酸緩衝液などを用いればよく、濃度としては20 mM～0.5 M、pHとしては5～8が挙げられる。

再生工程時のタンパク質濃度は、500 μ g/ml程度以下に抑えるのが好ましい。再生したペプチド生成酵素が自己架橋を行うのを抑えるために、透析温度
20 は5℃以下であることが好ましい。また、変性剤除去の方法として、この透析法のほか、希釈法、限外濾過法などがあり、いずれを用いても活性の再生が期待できる。

ペプチド生成酵素をコードするDNAとして、配列表配列番号4に示されるDNAを用いた場合には配列番号5に記載のアミノ酸配列を有するペプチド生成酵
25 素が生産される。また、ペプチド生成酵素をコードするDNAとして、配列表配列番号14に示されるDNAを用いた場合には配列番号15に記載のアミノ酸配列を有するペプチド生成酵素が生産される。また、ペプチド生成酵素をコードす

るDNAとして、配列表配列番号16に示されるDNAを用いた場合には配列番号17に記載のアミノ酸配列を有するペプチド生成酵素が生産される。

なお、遺伝子工学的な手法については、例えば Molecular Cloning, 2nd edition, Cold Spring Harbor press (1989)などの文献に記載された手法に準拠して実施することができる。

〔III〕 ペプチド生成酵素の性質

つぎに、上記微生物のうち、例として、コリネバクテリウム グルタミカム ATCC 13286 株から精製されたペプチド生成酵素の性質について説明する。

10 L-アラニンエステルとL-グルタミンとを原料（基質）とする場合を例にとると、当該ペプチド生成酵素は、L-アラニンエステルとL-グルタミンとを基質としL-アラニル-L-グルタミンを生成する活性を有する。また、L-アラニンアミドとL-グルタミンとを原料とする場合を例にとると、当該ペプチド生成酵素は、L-アラニンエステルとL-アスパラギンとを基質としL-アラニル-L-アスパラギンを生成する活性を有する。

15 作用としては、L-アラニンエステルと、L-アスパラギンまたはL-グルタミンとを原料とする場合を例にとると、当該ペプチド生成酵素は、L-アラニンエステル1分子とL-グルタミン1分子からL-アラニル-L-グルタミン1分子とアルコール1分子を生成、L-アラニンエステル1分子とL-アスパラギン1分子からL-アラニル-L-アスパラギン1分子とアルコール1分子を生成する。

20 至適pHは6.0から10.0付近にあり、至適温度は30から50℃付近にある。サブユニットの分子量はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって42,000～46,000と算出される。

〔IV〕 ジペプチドの製造方法

25 本発明のジペプチドの製造方法は、L-アミノ酸エステルとL-アミノ酸とからジペプチドを合成する活性を有する酵素または当該酵素含有物を用いてジペプチドを製造する方法である。具体的には、L-アミノ酸エステルとL-アミノ酸

とからジペプチドを生成する能力を有する微生物の培養物、該培養物より分離した微生物菌体、該微生物の菌体処理物、または、該微生物に由来するペプチド生成酵素を用いて、L-アミノ酸エステルおよびL-アミノ酸からジペプチドを製造するものである。なお、L-アミノ酸エステルおよびL-アミノ酸からジペプチドを生成する活性を有する限り、上記または下記表1などに例示した微生物に由来するプロリンイミノペプチダーゼ活性を有するタンパク質を用いることもできる。

上記微生物の産生するペプチド生成酵素は、L-アミノ酸エステルとL-アミノ酸を基質としてジペプチドを生成する活性を有するものである。

10 上記微生物の産生するペプチド生成酵素をL-アミノ酸エステルおよびL-アミノ酸に作用せしめる方法としては、上記微生物を培養しながら、培養液中に直接基質を添加してもよいし、培養終了後の培養液あるいは微生物培養物から遠心分離等により菌体を分離し、これをそのままもしくは洗浄した後、緩衝液に再懸濁したものにL-アミノ酸エステル・アミノ酸を添加して反応させてもよい。あるいは、ポリアクリルアミドゲル法、カラギーナン法、アルギン酸ゲル法等の公知の方法で固定化した菌体を用いることができる。

また、微生物菌体の処理物として、菌体破砕物、アセトン処理菌体、凍結乾燥菌体を用いてもよい。菌体破砕には超音波破砕、フレンチプレス破砕、ガラスビーズ破砕等の方法を用いることができ、また溶菌させる場合には卵白リゾチームや、ペプチターゼ処理、またはこれらを適宜組み合わせた方法が用いられる。

さらに、当該微生物菌体処理物からペプチド生成酵素を回収し、粗酵素液として使用してもよいし、必要に応じて、酵素を精製して用いてもよい。培養物からの精製法としては通常の酵素精製法をもちいることができる。具体的には遠心分離等によって菌体を集め、超音波処理、ガラスビーズ、ダイノミルなどの機械的方法によって菌体を破砕し、細胞片等の固形物を遠心分離によって除き、粗酵素を得て、超遠心分離分画、塩析、有機溶媒沈殿、イオン交換クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフ

ィー等を行うことによって上述のペプチド生成酵素が精製される。

なお、「微生物に由来するペプチド生成酵素」とは、当該微生物菌体処理物から上記精製工程を経て得られた酵素のみならず、当該酵素の遺伝子を異種または同種の宿主において発現させることによる、いわゆる遺伝子工学的手法によって生産された酵素をも含む。

すなわち、L-アミノ酸エステルとL-アミノ酸とからジペプチドを生成する活性を有する画分であれば、酵素と当該酵素含有物全てを使用することが可能である。ここで、「酵素含有物」とは、当該酵素を含有するものであればよく、具体的形態としては、当該酵素を生産する微生物の培養物、当該培養物から分離された微生物菌体、菌体処理物などが含まれる。微生物の培養物とは、微生物を培養して得られる物のことであり、より具体的には、微生物菌体、その微生物の培養に用いた培地および培養された微生物により生成された物質の混合物などのことをいう。また、微生物菌体は洗浄し、洗浄菌体として用いてもよい。また、菌体処理物には、菌体を破砕、溶菌、凍結乾燥したものなどが含まれ、さらに菌体などを処理して回収される粗酵素、さらに精製した精製酵素なども含まれる。精製処理された酵素としては、各種精製法によって得られる部分精製酵素等を使用してもよいし、これらを共有結合法、吸着法、包括法等によって固定化した固定化酵素を使用してもよい。また、使用する微生物によっては、培養中に一部、溶菌するものもあるので、この場合には培養液上清も酵素含有物として利用できる。

なお、培養物、培養菌体、洗浄菌体、菌体を破砕あるいは溶菌させた菌体処理物を用いる場合には、ペプチドの生成に関与せずに生成ペプチドを分解する酵素が存在することが多く、この場合には、金属酵素阻害剤、例えばエチレンジアミン四酢酸（EDTA）のような金属プロテアーゼ阻害剤などを添加するほうが好ましい場合がある。添加量は、0.1 mMから100 mMの範囲で、好ましくは1 mMから50 mMである。

酵素または酵素含有物の使用量は、目的とする効果を発揮する量（有効量）であればよく、この有効量は当業者であれば簡単な予備実験により容易に求められ

るが、例えば洗浄菌体を用いる場合は反応液 1 リットル当たり 1 ~ 5 0 0 g である。

L-アミノ酸エステルとしては、当該ペプチド生成酵素の基質特異性において L-アミノ酸とジペプチドを生成できる L-アミノ酸エステルであればいかなるものも使用でき、例えば、L-アミノ酸のメチルエステル、エチルエステル、n-プロピルエステル、iso-プロピルエステル、n-ブチルエステル、iso-ブチルエステル、tert-ブチルエステル等が挙げられる。また、天然型のアミノ酸に対応した L-アミノ酸エステルだけでなく、非天然型のアミノ酸もしくはその誘導体に対応する L-アミノ酸エステルも使用可能である。本発明において、L-アミノ酸エステルとして好ましくは、L-アミノ酸エステルは、L-アラニンエステル、グリシンエステル、L-バリンエステル、L-イソロイシンエステル、L-メチオニンエステル、L-フェニルアラニンエステル、L-セリンエステル、L-スレオニンエステル、L-グルタミンエステル、L-チロシンエステル、L-アルギニンエステル、L-アスパラギン酸- α -エステル、L-アスパラギン酸- β -エステル、L-ロイシンエステル、L-アスパラギン酸- α 、 β -ジメチルエステル、L-グルタミン- γ -エステルなどを用いることができる。

L-アミノ酸としては、当該ペプチド生成酵素の基質特異性において L-アミノ酸エステルとジペプチドを形成するものであれば特に限定なく公知のものを使用できる。本発明においては、L-アミノ酸として好ましくは、L-グルタミン、L-アスパラギン、グリシン、L-アラニン、L-ロイシン、L-メチオニン、L-プロリン、L-フェニルアラニン、L-トリプトファン、L-セリン、L-スレオニン、L-チロシン、L-リジン、L-アルギニン、L-ヒスチジンおよび L-グルタミン酸など、特に好ましくは、L-グルタミン、L-アスパラギンなどを用いることができる。

出発原料である L-アミノ酸エステルおよび L-アミノ酸の濃度は各々 1 mM ~ 1 0 M、好ましくは 0. 0 5 M ~ 2 M であるが、L-アミノ酸エステルに対し

てL-アミノ酸を等量以上添加したほうが好ましい場合がある。また、必要ならば、例えば基質が高濃度だと反応を阻害するような場合には、反応中にこれらを阻害しない濃度にして逐次添加する事ができる。

反応温度は3～70℃、好ましくは5～50℃であり、反応pHはpH2～12好ましくはpH3～11である。かくして2～48時間程度反応を行うことにより、反応混合物中にジペプチドが生成蓄積する。生成されたジペプチドは、定法により回収し、必要に応じて精製することができる。

実施例

以下、実施例をあげて、さらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。なお、実施例におけるL-アラニン、L-アラニル-L-グルタミンまたはL-アラニル-L-アスパラギンの定量は高速液体クロマトグラフィーを用いる方法（カラム：GLサイエンス社製 Inertsil ODS-2、溶離液：リン酸水溶液（pH2.2、5.0mM 1-オクタンスルホン酸ナトリウム溶液／メタノール＝100／15、流量：1.0mL/min、検出210nm）により行った。

（実施例1） L-アラニル-L-グルタミン生成に対するEDTAの添加効果
1L中にグルコース 5g、硫酸アンモニウム 5g、リン酸一カリウム 1g、リン酸二カリウム 3g、硫酸マグネシウム 0.5g、酵母エキス 10g、ペプトン 10gを含む培地（pH7.0）50mLを500mL坂口フラスコに分注し、115℃で15分殺菌した。これに同組成を含む斜面寒天培地（寒天20g/L、pH7.0）にて30℃、24時間培養したシュドモナス プチダ（*Pseudomonas putida*） FERM BP-8101 株を1白金耳接種し、30℃、120往復/分、で1.7時間振とう培養を行った。培養後菌体を遠心分離し、湿菌体として100g/Lになるように100mM 1Mホウ酸緩衝液（pH9.0）にて懸濁した。菌体懸濁液1mLを、EDTA無添加、もしくはEDTA20mMを含み、L-アラニンエチルエステル塩酸塩200mM、及びL-グルタミン

400 mMを含む100 mMホウ酸緩衝液 (pH 9.0) 1 mL (基質溶液) にそれぞれ添加し、全量を2 mLとした後、30℃にて1時間反応をおこなった。この結果、EDTA無添加区では4.9 mM、EDTA添加区では10.1 mMのL-アラニル-L-グルタミンが生成した。

- 5 尚、これらの反応系において、菌体懸濁液の代わりに100 mMホウ酸緩衝液 (pH 9.0) 1 mLを基質溶液1 mLに添加した条件(菌体無添加区)、および基質溶液の替わりに、L-アラニンエチルエステル塩酸塩とグルタミンを含まない、EDTA無添加あるいは20 mM EDTAを含有する100 mMホウ酸緩衝液 (pH 9.0) 1 mLを菌体懸濁液に添加した条件(基質無添加区)で
10 は、いずれの場合もL-アラニル-L-グルタミンの生成は見られなかった。

(実施例2) 基質としてのアミノ酸エステル

- 実施例1と同様に調製したシュードモナス プチダ (*Pseudomonas putida*) FERM BP-8101 株の菌体懸濁液湿菌体 (100 g/L) 1 mLを、EDTA 20 mMと下記のL-アラニンエステル塩酸塩200 mM、及びL-グルタミン400
15 mMを含む100 mMホウ酸緩衝液 (pH 9.0) 1 mLにそれぞれ添加し、全量を2 mLとした後、30℃にて1時間反応をおこなった。この結果、L-アラニンメチルエステル塩酸塩とL-グルタミンを基質した場合には、14.9 mM、L-アラニンエチルエステル塩酸塩とL-グルタミンを基質した場合には、11.4 mM、L-アラニン-tert-ブチルエステル塩酸塩とL-グルタミンを基質した
20 場合には、0.5 mMのL-アラニル-L-グルタミンが生成した。

(実施例3) 基質としてのL-アミノ酸

- 実施例1と同様に調製した シュードモナス プチダ FERM BP-8101 株の菌体懸濁液湿菌体 (100 g/L) 1 mLを、EDTA 20 mMとL-アラニンメチル
25 0 mMを含む100 mMホウ酸緩衝液 (pH 9.0) 1 mLにそれぞれ添加し、全量を2 mLとした後、30℃にて1時間反応を行った。この結果、L-アラニンメチルエステル塩酸塩とL-グルタミンを基質した場合には、12.7 mMの

L-アラニル-L-グルタミン、L-アラニンメチルエステル塩酸塩とL-アスパラギンを基質した場合には、4.8 mMのL-アラニル-L-アスパラギンが生成した。

(実施例4) L-アラニル-L-グルタミンを生成する微生物

- 5 微生物の培養には、1 L中にグルコース 5 g、硫酸アンモニウム 5 g、リン酸一カリウム 1 g、リン酸二カリウム 3 g、硫酸マグネシウム 0.5 g、酵母エキス 10 g、ペプトン 10 gを含む培地 (pH 7.0) 50 mLを500 mL坂口フラスコに分注し、115℃で15分殺菌したものを用いた。これに1 L中にグルコース 5 g、酵母エキス 10 g、ペプトン 10 g、NaC
- 10 1 5 gを含む斜面寒天培地 (寒天 2 g/L、pH 7.0) にて30℃、24時間培養した表1に示す細菌を1白金耳接種し、30℃、120往復/分、で17時間振とう培養を行った。培養後菌体を遠心分離し、湿菌体として100 g/Lになるように10 mMのEDTAを含む0.1 Mホウ酸緩衝液 (pH 9.0) にて懸濁した。培養終了後、これらの培養液から菌体を遠心分離し、湿菌体として10
- 15 0 g/Lになるように10 mMのEDTAを含む0.1 Mホウ酸緩衝液 (pH 9.0) にて懸濁した。これらの微生物の菌体懸濁液0.1 mLに、EDTA 10 mM、L-アラニンメチルエステル塩酸塩 200 mM、及びL-グルタミン 400 mMを含む100 mMホウ酸緩衝液 (pH 9.0) 0.1 mLをそれぞれ添加し、全量を0.2 mLとした後、25℃にて2時間反応をおこなった。このときのL
- 20 -アラニル-L-グルタミン (Ala-Gln) の生成量 (mM) を表1に示す。

表 1

微生物	Ala-Gln (mM)
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	1.1
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13286	7.2
<i>Pseudomonas putida</i> FERM BP-8101	14.8

(実施例 5) L-アラニル-L-グルタミン生成に及ぼす温度の影響

実施例 4 の微生物の培養法に従って調製したシュードモナス プチダ FERM
 5 BP-8101 株菌体懸濁液 (100 g/L) 1 mL を、EDTA 10 mM、L-アラニン
 メチルエステル塩酸塩 200 mM、L-グルタミン 400 mM を含む 100
 mM ホウ酸緩衝液 (pH 9.0) 1 mL にそれぞれ添加し、全量を 2 mL とした
 後、20℃、30℃、40℃にてそれぞれ 1 時間反応をおこなった結果を表 2 に
 示した。L-アラニル-L-グルタミン (Ala-Gln) の生成は、シュードモナス プ
 10 チダ FERM BP-8101 株の場合には 40℃において最も高い値を示した。

表 2

微生物	生成 Ala-Gln (mM)		
	20℃	30℃	40℃
<i>Pseudomonas putida</i> FERM BP-8101	8.2	16.9	20.8

(実施例 6) コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium*
 15 *glutamicum*) ATCC 13286 株からのペプチド生成酵素の精製と精製酵素による L-
 アラニル-L-グルタミンの生産

1 L 中にグルセロール 5 g、酵母エキス 5 g、ペプトン 5 g、塩化ナト
 リウム 5 g、L-アラニンアミド塩酸塩 5 g を含む培地 500 mL を 5 L 坂口

フラスコに分注し、120℃、20分殺菌した。これに、上記と同じ組成の培地で20時間培養したコリネバクテリウム グルタミカム ATCC 13286 株の培養液を5% (V/V) になるように植菌し、30℃、120往復/分で20時間培養した。この培養液8 Lから遠心分離により菌体を集めた。以下の操作は氷上あるいは

5 4℃にて行った。菌体を50 mM磷酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) にて洗浄後、0.1 mm径のガラスビーズをもちいて約10分間破碎処理を行った。ガラスビーズと菌体破碎液を分離し、20,000×g、30分の遠心分離にて破碎菌体片を除去し、無細胞抽出液を得た。更に200,000×g、60分の超遠心分離にて不溶性画分を除去し、上清液として可溶性画分を得た。得られた可溶性画

10 分に硫酸アンモニウムを60%飽和になるように添加し、20,000×g、30分の遠心分離によって沈殿を回収した。得られた沈殿を少量の50 mM磷酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) に溶解し、50 mM磷酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) に対して透析した。この酵素液を50 mM磷酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) で予め平衡化したQ-Sepharose HP カラムに供し、0~1.0M 塩化ナトリウム

15 を含む50 mM磷酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) の直線的な濃度勾配で酵素を溶出させた。活性画分を集め、50 mM磷酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) で予め平衡化したSuperdex 200 pg に供し、同緩衝液で酵素を溶出させた。活性画分を集め、0.5M 硫酸アンモニウムを含む20 mM磷酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) に対して透析を行い、0.5M硫酸アンモニウムを含む20 mM磷酸カリウ

20 ム緩衝液 (pH 7.0) で予め平衡化したPhenyl-SepharoseHP に供した。0.5~0M 硫酸アンモニウムを含む20 mM磷酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) の直線的な濃度勾配で酵素を溶出させた。活性画分を集め、50 mM磷酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) に対して透析し、これを50 mM磷酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) で予め平衡化したMonoQ カラムに供し、0~1.0M塩化ナトリウム

25 を含む50 mM磷酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) の直線的な濃度勾配で酵素を溶出させた。こうしてペプチド精製酵素を電気泳動的に均一に精製した。

本精製酵素の比活性は9.841 Unit/mgで、これらの精製過程を通じて当該

ペプチド精製酵素の比活性は約 246 倍に上昇した。また、本精製酵素標品の分子量を SDS ポリアクリルアミド電気泳動に供した結果、分子量 42,000 ~ 46,000 と算出される位置に均一なバンドが検出された。尚、酵素の力価の測定は以下の通り行った。トリス塩酸緩衝液 (pH 9.0) 200 μ mol、L-アラニンアミド 50 μ mol および適当量の酵素液を加え、全量が 1 ml となるように混合し、30℃にて 60 分間反応させた後、リン酸水溶液 (pH 2.1) を 4 ml 加え反応を停止した。生成したアラニンを高速液体クロマトグラフィーで定量し、1 分間に 1 μ mol の L-アラニンを生成する酵素量を 1 単位とした。

この精製酵素を EDTA、L-アラニンメチルエステル塩酸塩、及び L-グルタミン (あるいは L-アスパラギン) を含むホウ酸緩衝液 (pH 9.0) に加え、全量が 1 mL になるように混合 (終末濃度として、酵素添加量はアラニンアミド分解活性として 2 Unit、EDTA 10 mM、L-アラニンメチルエステル塩酸塩 100 mM、L-グルタミン 200 mM (あるいは L-アスパラギン 200 mM)、ホウ酸緩衝液 100 mM) し、30℃にて 4 時間反応させた (尚、酵素の unit 数は L-アラニンメチルエステルと L-グルタミンからの L-アラニル-L-グルタミン生成活性ではなく、簡便な L-アラニンアミド分解活性で示した)。このとき L-アラニル-L-グルタミンの生成量は 50.2 mM、L-アラニル-L-アスパラギンの生成量は 49.8 mM であった。

(実施例 7) コリネバクテリウム グルタミカム ATCC 13286 株からのペプチド生成酵素遺伝子の単離と *E. coli* での発現

以下、コリネバクテリウム グルタミカム ATCC 13286 からのペプチド生成酵素遺伝子の単離と *Escherichia coli* (*E. coli*) での発現について述べる。遺伝子の単離、発現とも、*E. coli* JM109 を宿主に用い、ベクターは pUC18 を用いた。

1. 決定アミノ酸配列に基づいた PCR プライマーの作製

実施例 1 で得たコリネバクテリウム グルタミカム ATCC13286 株由来のペプチド生成酵素の N 末端アミノ酸配列 (配列表配列番号 1) をもとに、配列表配列番号 2、3 にそれぞれ示すミックスプライマーを作製した。

2. 菌体の取得

コリネバクテリウム グルタミカム ATCC 13286 株を CM2G1y 寒天
培地 (0.5 g/dl グリセロール、1.0 g/dl 酵母エキス、1.0
g/dl ペプトン、0.5 g/dl NaCl、2 g/dl 寒天、pH 7.
5 0) 上で 30℃、24 時間培養し菌をリフレッシュした。これを 50 ml の
CM2G1y 液体培地を張り込んだ 500 ml の坂口フラスコに 1 白金耳植菌
し、30℃、16 時間好氣的に振盪培養した。

3. 菌体からの染色体 DNA の取得

培養液 50 ml を遠心分離操作 (12,000 rpm、4℃、15 分間) に供し、
10 集菌した。この菌体を 10 ml の 20 mM EDTA を含む 50 mM トリス塩酸緩
衝液 (pH 8.0) に懸濁し、遠心分離操作により菌体を回収した。再び、この菌
体を 10 ml の 20 mM EDTA を含む 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0)
に懸濁した。さらに、この懸濁液に、0.5 ml の 20 mg/ml リゾチーム溶
液、1 ml の 10% SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) 溶液を加えた後、55℃
15 で 20 分間インキュベートした。このインキュベートした溶液に、1 mM ED
TA を含む 10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) で飽和したフェノールを等
量加えて除タンパクを行った。この分離した水層に対して、等量の 2-プロパノ
ールを加えて、DNA を沈澱させ、回収した。沈澱した DNA を 20 mM EDT
A を含む 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) 0.5 ml に溶解した後、5
20 μ l の 10 mg/ml RNase、5 μ l の 10 mg/ml Proteinase K を加えて、
55℃ で 2 時間反応させた。反応後、この溶液に等量の 1 mM EDTA を含む 1
0 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) で飽和したフェノールで除タンパクを行
った。さらに、分離した水層に等量の 24:1 クロロホルム/イソアミルアル
コールを加えて攪拌し、水層を回収した。この操作をさらに 2 回行った後に得ら
25 れた水層に、終濃度 0.4 M となるように 3 M 酢酸ナトリウム溶液 (pH 5.
2) を加え、さらに 2 倍容のエタノールを加えた。沈澱となって生じた DNA を
回収し、70% エタノールで洗浄した後、乾燥させ、1 ml の 1 mM EDTA を

含む 10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) に溶解させた。

4. カセット PCR 法によるペプチド生成酵素遺伝子の一部を含む DNA 断片の取得

カセット PCR 法によるペプチド生成酵素をコードする遺伝子 (*aah*) を含む DNA 分子の単離・増幅には、TaKaRa LA PCR in vitro Cloning Kit (宝酒造社製) を用いた。以下断わりの無い限り、説明書の方法に基づき実験を行った。カセット PCR 法において、プライマー 1 (1st PCR、配列表配列番号 2) と 2 (2nd PCR、配列表配列番号 3) をプライマーとした場合に、EcoR I カセットとの間で約 0.5 kb のバンド (フラグメント 1) が増幅した。この断片の塩基配列を決定することにより、フラグメント 1 が *aah* の一部分であることを確認した。

5. 遺伝子ライブラリーからのペプチド生成酵素遺伝子のクローニング

次に、*aah* の全長取得のために、フラグメント 1 をプローブとしてまず、サザンハイブリダイゼーションを行った。

プローブとなる DNA 断片を約 50 ng/μl に調整し、この DNA 溶液 16 μl を DIG High Prime (Boehringer Mannheim) を使用して、プロトコールに準じて 37℃ で 24 時間インキュベートしてプローブの標識を行った。

染色体 DNA 1 μg を各種制限酵素の組合わせで完全消化し、0.8% アガロースゲルで電気泳動した後に、ナイロンメンブレン (Boehringer Mannheim, Nylon membranes positively charged) にブロッティングした。以下定法に従ってサザンハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションは DIG Easy Hyb (Boehringer Mannheim) を用いて行い、50℃、30 分間プレハイブリダイゼーションを行った後にプローブを添加して、50℃、18 時間ハイブリダイゼーションさせた。検出は DIG Nucleotide Detection Kit (Boehringer Mannheim) を用いて行った。

その結果、Bgl II の切断物においては、約 7 kb の位置にバンドが検出された。この 7 kb 領域の断片を回収して pUC18 に連結し、*E. coli* JM109 にてライブラリー (120 株) を作製した。以下定法に従ってコロニーハイブリダイゼーション

ンを行った。コロニーをナイロンメンブレンフィルター (Boehringer Mannheim, Nylon membranes for colony and plaque hybridization) に転写し、アルカリ変性、中和、固定化の処理を行った。ハイブリダイゼーションは DIG Easy Hyb を用いて行った。フィルターを buffer 中に浸し、42℃、30分間プレハイブリダイゼーションを行った。その後、上述の標識プローブを添加し、42℃、18時間ハイブリダイゼーションを行った。SSC buffer での洗浄後、DIG Nucleotide Detection Kit を用いてポジティブクローン1株を選抜した。

6. コリネバクテリウム グルタミカム ATCC13286 由来ペプチド生成酵素遺伝子の塩基配列

10 選抜した形質転換体が保有するプラスミドを Molecular Cloning, 2nd edition, Cold Spring Harbor press (1989) に記載される方法に従って調製し、プローブとハイブリダイズした近傍の塩基配列を決定した。ペプチド生成酵素の30残基のN末端アミノ酸配列を含むタンパク質をコードするオープンリーディングフレーム (ORF) が存在し、ペプチド生成酵素をコードする遺伝子 *aah* であることを確認した。ペプチド生成酵素遺伝子全長の塩基配列を配列表配列番号4に示した。得られた ORF は既知のプロピオニバクテリウム (*Propionibacterium*) 属細菌由来のプロリンイミノペプチダーゼ (proline iminopeptidase) と塩基配列で57.6%の相同性を示した。なお、相同性の数値は Genetyx を用いて得られた値である (以下、本実施例において同じ)。

20 7. ペプチド生成酵素遺伝子の *E. coli* での発現

aah を *E. coli* で発現させるために、pUC18 の lac プロモーターの下流に *aah* を連結したプラスミド pUCAAH を構築した。コリネバクテリウム グルタミカム ATCC13286 染色体DNAを鋳型とし、表3に示すオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCRにより増幅した断片を *Sac* I、*Sma* I で処理し、pUC18 の *Sac* I、*Sma* I 切断物とライゲーションした後、*E. coli* JM109 に形質転換した。アンピシリン耐性株の中から、目的のプラスミドを持った株を選択し、構築した発現プラスミド pUCAAH と命名した。

表3 ペプチド生成遺伝子発現ベクター構築に用いたプライマー

プライマー	配列
5' 側	GGCGAGCTCGGGCAGTGGTGGGGGTGGTGT <i>Sac</i> I 配列番号 6
3' 側	CGGGGGCCCTCAGCGTACCTCTCGGCCGTG <i>Sma</i> I 配列番号 7

pUCAAH を持つ *E. coli* でのペプチド生成酵素の発現形質転換体を 0.1 mg / ml アンピシリンを含む LB 培地で、37℃、16 時間、シード培養した。LB 培地 50 ml を張り込んだ 500 ml 坂口フラスコに、この前培養液を 1 ml シードし、37℃にて本培養を行った。培養開始 2 時間後に、終濃度 1 mM となるようにイソプロピル 1-チオ-β-D-ガラクトピラノシド (IPTG) を添加し、さらに 3 時間培養を行った。

10 培養終了後、集菌、洗浄を行い、10 ml の 20 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) に懸濁し、180 W、30 分間、超音波破碎した。溶液を回収し、12,000 g × 10 分の遠心分離操作を行い、その上清を無細胞抽出液とした。

(実施例 8) ペプチド生成酵素活性測定

1. コリネバクテリウム グルタミカム ATCC13286 由来酵素の活性

15 上記のようにして培養終了後、無細胞抽出液を調製し、これを酵素源としてペプチド生成酵素活性の測定を行った。ペプチド生成酵素活性の測定は、100 mM L-アラニンメチルエステル塩酸塩、150 mM L-グルタミン、100 mM ホウ酸緩衝液 (pH 9.0)、10 mM EDTA および酵素溶液を含む反応液を 30℃で 60 分インキュベートした後、4 倍容のリン酸 (pH 1.5) を添加することにより反応を停止させた。HPLC にて L-アラニン-L-グルタミン量を定量することによった。酵素活性の単位として、この条件にて 1 分間に 1 μm

o 1 の L-アラニル-L-グルタミンを生成する酵素活性をもって 1U と定義した。

分析に用いた HPLC の条件は以下の通り。

カラム : Inertsil ODS-2

- 5 移動相 : (リン酸水溶液 (pH 2.1)) , 2.5mM sodium-1-octanesulfonate/
methanol=10/1

カラム温度 : 40℃

流速 : 1.0ml/分

検出 : UV 210nm

- 10 その結果、pUC18AAH を導入した場合に、0.54 U/mg の L-アラニンメチル
エステル塩酸塩からの L-アラニル-L-グルタミン合成の活性が検出され、ク
ローニングした *aah* 遺伝子が *E. coli* で発現したことを確認した。なお、対照と
して pUC18 のみを導入した場合には、活性は検出されなかった。

2. His-Tag ペプチド生成酵素遺伝子の *E. coli* での発現

- 15 *aah* を *E. coli* で発現させるために、pUC18 の lac プロモーターの下流に His-Tag
タンパクとしてペプチド生成酵素を発現させるプラスミド pQEAAH を構築した。コ
リネバクテリウム グルタミカム ATCC13286 株染色体 DNA を鋳型とし、表 4 に
示すオリゴヌクレオチドをプライマーとして PCR により増幅した断片を *Sac* I、
Sma I で処理し、pQE-30 (Qiagen 社) の *Sac* I、*Sma* I 切断物とライゲーションし
20 た後、*E. coli* JM109 に形質転換した。アンピシリン耐性株の中から、目的のプ
ラスミドを持った株を選択し、構築した発現プラスミド pQEAAH と命名した。

表 4 His-Tag ペプチド生成酵素発現ベクター構築に用いたプライマー

プライマー	配列
5' 側	GGC <u>GAG CTC</u> ATG ACT AAA ACA CTT GGT TCC <i>Sac</i> I 配列番号 8
3' 側	CGG <u>GGG CCC</u> TCA GCG TAC CTC TCG GCC GTG <i>Sma</i> I 配列番号 7

pQEAAH を持つ *E. coli* でのペプチド生成酵素の発現形質転換体について、実施例 8 と同様の方法で活性測定したところ、 5.26 U/mg のペプチド生成酵素活性を示した。

5 3. His-Tag 精製酵素の調製

pQEAAH を持つ *E. coli* JM109 の培養液 150 ml から、上記の方法で菌体破碎し、His Trap kit (Amersham Pharmacia Biotech 社製) を用い、その添付プロトコールに従って His-Tag L-アラニンアミドヒドロラーゼを精製した。SDS-PAGE 上で単一バンドを示すタンパクが 24 mg 取得された。その精製酵素の L-アラニンメチルエステル塩酸塩からの L-アラニル-L-グルタミン合成の比活性は 148.3 U/mg であり、L-アラニンメチルエステル塩酸塩に対して 50.7% であった。

4. His-Tag 精製酵素を用いた基質特異性の検討

取得したペプチド生成酵素による L-アラニル-L-グルタミン以外のペプチド合成について His-Tag 精製酵素を用いて検討を行った。

(1) L-アラニンメチルエステルと他の L-アミノ酸からのペプチド合成

合成反応は、 100 mM L-アラニンメチルエステル塩酸塩、 150 mM 供試アミノ酸、 100 mM ホウ酸緩衝液 ($\text{pH} 9.0$)、 10 mM EDTA および酵素溶液 (0.05 U/ml) を含む反応液を 25°C で 3 時間インキュベートし、生成したペプチドを HPLC で定量した。その結果、L-アミノ酸として L-アスパラギンを用いた場合には、 22.34 mM の L-アラニル-L-アスパラギン、グリシンを用いた場合には、 5.66 mM の L-アラニル-グリシン、L-アラニンを用いた場合には、 10.63 mM の L-アラニル-L-アラニン、L-ロイシンを用いた場合には、 13.73 mM の L-アラニル-L-ロイシン、L-メチオニンを用いた場合には、 48.80 mM の L-アラニル-L-メチオニン、L-プロリンを用いた場合には、 1.02 mM の L-アラニル-L-プロリン、L-フェニルアラニンを用いた場合には、 16.13 mM の L-アラニル

ーL-フェニルアラニン、L-トリプトファンを用いた場合には、15.31 mMのL-アラニル-トリプトファン、L-セリンを用いた場合には、26.14 mMのL-アラニル-L-セリン、L-スレオニンを用いた場合には、24.23 mMのL-アラニル-L-スレオニン、L-チロシンを用いた場合には0.96 mMのL-アラニル-L-チロシン、L-リジンを用いた場合には、7.91 mMのL-アラニル-L-リジン、L-アルギニンを用いた場合には、24.87 mMのL-アラニル-L-アルギニン、L-ヒスチジンを用いた場合には、23.16 mMのL-アラニル-L-ヒスチジンおよびL-グルタミン酸を用いた場合には、1.11 mMのL-アラニル-L-グルタミン酸が生成された。

- 10 (2) 他のL-アミノ酸メチルエステルとL-グルタミンからのペプチド合成
L-アラニンメチルエステル以外のアミノ酸メチルエステルを用いて反応を行った。

- 合成反応は、100 mM供試アミノ酸メチルエステル、150 mM L-グルタミン、100 mM ホウ酸緩衝液(pH 9.0)、10 mM EDTAおよび酵素(0.05 U/ml)を含む反応液を25℃で3時間インキュベートし、生成したペプチドをHPLCで定量した。その結果、L-アミノ酸メチルエステルとしてグリシンメチルエステルを用いた場合には、52.19 mMのグリシル-L-グルタミン、L-バリンメチルエステルを用いた場合には、5.94 mMのL-バリル-L-グルタミン、L-イソロイシンメチルエステルを用いた場合には、0.59 mMのL-イソロイシル-L-グルタミン、L-メチオニンメチルエステルを用いた場合には、4.31 mMのL-メチオニル-L-グルタミン、L-フェニルアラニンメチルエステルを用いた場合には、3.67 mMのL-フェニルアラニル-L-グルタミン、L-セリンメチルエステルを用いた場合には、40.44 mMのL-セリル-L-グルタミン、L-スレオニンメチルエステルを用いた場合には、3.85 mMのL-スレオニル-L-グルタミン、L-グルタミンメチルエステルを用いた場合にはでは0.23 mMのL-グルタミニル-L-グルタミン、L-チロシンメチルエステルを用いた場合には、1.24 mMのL-チ
- 15
- 20
- 25

ロシルーL-グルタミン、L-アルギニンメチルエステルを用いた場合には、6.52 mMのL-アルギニルーL-グルタミン、L-アスパラギン酸- α -メチルエステルを用いた場合には8.22 mMのL-アスパルチルー α -L-グルタミンが生成された。また、アミノ酸メチルエステルとしてL-ロイシンメチルエステル、あるいはL-アスパラギンメチルエステル、あるいはL-リジンメチルエステル、あるいはL-アスパラギン酸- β -メチルエステル、あるいはL-アスパラギン酸- α , β -ジメチルエステル、あるいはL-グルタミン酸- γ -メチルエステルを用いた場合にも、対応するアミノ酸とL-グルタミンからなるペプチドの生成が確認された（標準品が入手できなかったため、定量はしていない）。

10 (3) プロリンイミノペプチダーゼ(pepI)活性の測定法

反応液（組成；50 mM ホウ酸緩衝液（pH 9.0）、5 mM EDTA、1 mM プロリン2-ナフチルアミド（proline-pNA））を用いて、30℃で反応を行った。ナフチルアミドの遊離速度を405 nmの吸光度の増大で測定（ $\epsilon = 9.83$ ）。1分間に1 μ molのナフチルアミドを放出する活性を1 Uとした。

15 精製酵素のプロリンイミノペプチダーゼ活性は、 5.83×10^3 U/mgであった。

（実施例9） シュードモナス プチダ ATCC12633 株プロリンイミノペプチダーゼ(pepI)遺伝子の単離と *E. coli*での発現

1. プロリンイミノペプチダーゼ(pepI)遺伝子部分断片の取得

20 実施例7の3.と同様の方法でシュードモナス・プチダ ATCC12633の培養菌体（50 ml 培養）から、DNAを単離した。

一方、Genbankに公開されているシュードモナス・プチダ ATCC12633株のプロリンイミノペプチダーゼ部分塩基配列（AF032970）に基づいて合成DNAオリゴマー（配列番号10：GGC GGA TCC GGT GCT CAA AGC GCA A、および、配列番号11：GGC GGA TC AGG TCG CCG CGT TCT TC）を作製し、これらをプライマーとして TaKaRa LA（宝酒造社製）を用いたPCR法により遺伝子部分断片を増幅した。

2. 遺伝子ライブラリーからのプロリンイミノペプチダーゼ遺伝子全長のクロ

ーニング

シュードモナス・プチダ ATCC12633 のプロリンイミノペプチダーゼ遺伝子 (pepI) の全長取得のために、この部分断片をプローブとして用いて、まず、実施例 7 の 5. に記載の方法と同様にしてサザンハイブリダイゼーションを行った。

- 5 その結果、XhoI の切断物においては、約 2.8 kb の位置にバンドが検出された。次に、この 2.8kb 領域の断片を回収して pUC18 の *Sal*I 部位に連結し、*E. coli* JM109 にてライブラリー (100 株) を作製した。実施例と同様の方法にてコロニーハイブリダイゼーションを行い、ポジティブクローン 1 株を選抜した。

10 3. シュードモナス・プチダ ATCC12633 株プロリンイミノペプチダーゼ遺伝子の塩基配列

- 選抜した形質転換体が保有するプラスミドを Molecular Cloning, 2nd edition, Cold Spring Harbor press (1989) に記載される方法に従って調製し、プローブとハイブリダイズした近傍の塩基配列を決定した。337 アミノ酸よりなるタンパク質をコードするオープンリーディングフレーム (ORF) が存在し、
15 この遺伝子全長を取得したことを確認した。プロリンイミノペプチダーゼ遺伝子全長の塩基配列を配列表配列番号 14 に示した。

なお、得られた ORF は既知のコリネ属細菌由来のプロリンイミノペプチダーゼと塩基配列 46.3% の相同性、シュードモナス・アルギノーサ PA01 のプロリンイミノペプチダーゼと 82.4% の相同性を示した。

20 4. プロリンイミノペプチダーゼ遺伝子の *E. coli* での発現

- プロリンイミノペプチダーゼ (pepI) 遺伝子を *E. coli* で発現させるために、pUC18 の lac プロモーターの下流に pepI 遺伝子を連結したプラスミド pUCPPPEPI を構築した。染色体 DNA を鋳型とし、配列番号 9、11 に示すオリゴヌクレオチド (配列番号 9 ; GGC GGA TCC GGT GCT CAA AGC GCA A、配列番号 11 ; CAC GCG
25 CTG CAG CAA ACC CCT CAT) をプライマーとして PCR により増幅した断片をで処理し、pUC18 切断物とライゲーションした後、*E. coli* JM109 に形質転換した。アンピシリン耐性株の中から、目的のプラスミドを持った株を選抜し、構築した

発現プラスミド pUCPPPEPI と命名した。

pUCPPPEPI を持つ *E. coli* 形質転換体を 0.1 mg/ml アンピシリンを含む LB 培地で、 37°C 、16 時間、シード培養した。LB 培地 50 ml を張り込んだ 500 ml 坂口フラスコに、この前培養液を 1 ml シードし、 37°C にて本培養を行った。培養開始 2 時間後に、終濃度 1 mM となるようにイソプロピル 1-チオー β -D-ガラクトピラノシド (IPTG) を添加し、さらに 3 時間培養を行った。

培養終了後、集菌、洗浄を行い、 10 ml の 20 mM リン酸緩衝液 ($\text{pH } 8.0$) に懸濁し、 180 W 、30 分間、超音波破碎した。溶液を回収し、 $12,000 \text{ g} \times 10$ 分の遠心分離操作を行い、その上清を無細胞抽出液とした。その結果、pUCPPPEPI を導入した場合のみプロリンイミノペプチダーゼ活性 ($1.21 \times 10^3 \text{ U/mg}$) が検出され、クローニングした *pepI* 遺伝子が *E. coli* で発現したことが確認された。

(実施例 10) シュードモナス・プチダ ATCC12633 株のプロリンイミノペプチダーゼによる L-アラニル-L-グルタミン合成

1. シュードモナス・プチダ ATCC12633 株における L-アラニル-L-グルタミン合成活性の検出

シュードモナス・プチダ ATCC12633 を L 培地で 30°C 一晚液体培養し、菌体を得た。取得した菌体を 0.1 M ホウ酸緩衝液 ($\text{pH } 9.0$)、 10 mM EDTA にけん濁し、酵素液とした。なお、L-アラニル-L-グルタミン合成活性は、以下の酵素活性測定法により行った。終濃度 0.1 M ホウ酸緩衝液 ($\text{pH } 9.0$)、 10 mM EDTA、 100 mM L-アラニンメチルエステル塩酸塩、及び 150 mM L-グルタミンとなる反応溶液にて 30°C にて酵素反応を行い、反応に伴い生じる L-アラニル-L-グルタミンを HPLC により定量した。一分間に $1 \mu\text{mol}$ の L-アラニル-L-グルタミンを生じる活性を 1 U とした。

培養液 1 ml あたり 0.051 U の L-アラニル-L-グルタミン合成活性が検出された。

2. プロリンイミノペプチダーゼ発現 *E. coli* による L-アラニル-L-グルタミン合成

上記無細胞抽出液を用いて、L-アラニル-L-グルタミン合成活性を測定した。その結果、pUCPPPEPI を導入した場合には 7.88 U/mg の L-アラニル-L-グルタミン合成活性が検出され、クローニングした pepI 遺伝子が L-アラニル-L-グルタミン合成酵素の遺伝子であることが確認された。L-アラニル-L-グルタミンの最高蓄積は 25 mM であった。

(実施例 11) シュードモナス プチダ FERM BP-8123 株プロリンイミノペプチダーゼ(pepI)遺伝子の単離と *E. coli* での発現

10 1. プロリンイミノペプチダーゼ(pepI)遺伝子部の取得

シュードモナス プチダ FERM BP-8123 株のプロリンイミノペプチダーゼ遺伝子(pepI)取得のために、実施例 1 と同様の方法でシュードモナス プチダ FERM BP-8123 株の培養菌体(50 ml 培養)から、DNA を単離した。

一方、実施例 9 で増幅したシュードモナス・プチダ ATCC12633 株の pepI 遺伝子部分断片をプローブとして用いて、まず、実施例 9 の 5. 同様の方法でサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、*Pst* I の切断物においては、約 6.5 kb の位置にバンドが検出された。

次に、この 6.5 kb 領域の断片を回収して pUC18 の *Pst* I 部位に連結し、*E. coli* JM109 にてライブラリー(200 株)を作製した。実施例と同様の方法にてコロニーハイブリダイゼーションを行い、ポジティブクローン 2 株を選抜した。

20 2. シュードモナス プチダ FERM BP-8123 株のプロリンイミノペプチダーゼ遺伝子の塩基配列

選抜した形質転換体が保有するプラスミドを Molecular Cloning, 2nd edition, Cold Spring Harbor press (1989) に記載される方法に従って調製し、プローブとハイブリダイズした近傍の塩基配列を決定した。323 アミノ酸よりなるタンパク質をコードするオープンリーディングフレーム(ORF)が存在し、この遺伝子全長を取得したことを確認した。プロリンイミノペプチダーゼ遺伝子全長の塩

基配列を配列表配列番号 16 に示した。得られた ORF はシュードモナス・プチダ ATCC12633 株のプロリンイミノペプチダーゼ遺伝子と塩基配列で 83%、アミノ酸配列で 85% の相同性を示した。

3. プロリンイミノペプチダーゼ遺伝子の *E. coli* での発現

5 *pepI* 遺伝子を *E. coli* で発現させるために、pUC18 の *lac* プロモーターの下流に *pepI* 遺伝子を連結したプラスミドを構築した。染色体 DNA を鋳型とし、配列番号 12、13 に示すオリゴヌクレオチド（配列番号 12 ; CCC GAA TTC TTA CGG AGC GCG CAA TG、配列番号 13 ; CGG GGA TCC CTT CAT GCT TCT TCA GG）をプライマーとして PCR により増幅した断片をで処理し、pUC18 切断物とライゲーションした後、*E. coli* JM109 に形質転換した。アンピシリン耐性株の中から、目的のプラスミドを持った株を選択し、構築した発現プラスミド pUCPGPEPI と命名した。

15 pUCPGPEPI を持つ *E. coli* 形質転換体を実施例 8 と同様の方法で無細胞抽出液を作成し、プロリンイミノペプチダーゼ活性を測定したところ活性 (3.48×10^1 U/mg) が検出され、クローニングした *pepI* 遺伝子が *E. coli* で発現したことが確認された。

（実施例 12） シュードモナス プチダ FERM BP-8123 株のプロリンイミノペプチダーゼによる L-アラニル-L-グルタミン合成

20 1. シュードモナスプチダ FERM BP-8123 株による L-アラニル-L-グルタミン合成活性の検出

シュードモナスプチダ FERM BP-8123 株を実施例 10 と同様に培養し酵素活性を測定した。培養液 1 ml あたり 0.054 U の L-アラニル-L-グルタミン合成活性が検出された。

2. L-アラニル-L-グルタミン合成酵素活性の検出

25 pUCPGPEPI を持つ *E. coli* 形質転換体無細胞抽出液を用いて、L-アラニル-L-グルタミン合成活性を測定した。その結果、pUCPGPEPI を導入した場合には 0.470 U/mg の L-アラニル-L-グルタミン合成活性が検出され、クローニング

した *pepI* 遺伝子が L-アラニル-L-グルタミン合成酵素の遺伝子であることが確認された。L-アラニル-L-グルタミンの最高蓄積は 30 mM であった。

(実施例 13) バチルス・コアギュランズ EK01 株のプロリンイミノペプチダーゼ活性を有する酵素による L-アラニル-L-グルタミン合成

- 5 東洋紡より市販されているバチルス・コアギュランズ EK01 株の精製酵素 ($3.9 \times 10^5 \text{ U/mg}$) をもちいて、実施例 10 に開示されている方法で L-アラニル-L-グルタミン合成活性を測定した。その結果、 52.0 U/mg の活性が検出され、このプロリンイミノペプチダーゼが L-アラニル-L-グルタミン合成活性を有する酵素であることが確認された。L-アラニル-L-グルタミン
- 10 の最高蓄積は 18 mM であった。

(実施例 14) 取得酵素の活性に対する阻害剤の影響

- 取得したプロリンイミノペプチダーゼに対する阻害剤の影響を調べた。0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH 9.0)、10 mM EDTA、100 mM L-アラニンメチルエステル塩酸塩、150 mM L-グルタミン、および 1 mM 阻害剤となる
- 15 反応溶液にて 30°C にて 30 分間酵素反応を行い、L-アラニル-L-グルタミン合成を測定した。バチルス コアギュランズ EK01、シュードモナス プチダ ATCC12633 株、シュードモナス プチダ FERM BP-8123 株については、NEM (N-エチルマレイミド) を 1 mM 添加すると、酵素活性はほぼ完全に阻害された。また、1 mM の IAA (ヨードアセトアミド) 添加によって、活性がある程度減少
- 20 した。一方、1 mM の PMSF (フェニルメチルスルフォニルフロリド) 添加時には活性に影響はなかった。コリネバクテリウム グルタミカム ATCC13286 株については、調べたどの阻害剤でも活性は影響を受けなかった。

(配列表フリーテキスト)

- 25 配列番号 1: コリネバクテリウム グルタミカム由来のペプチド生成酵素の N 末端アミノ酸配列

配列番号 2: PCR 用プライマー

配列番号 3 : PCR用プライマー

配列番号 4 : コリネバクテリウム グルタミカム由来のペプチド生成酵素のコードシーケンス

配列番号 5 : コリネバクテリウム グルタミカム由来のペプチド生成酵素のアミ

5 ノ酸配列

配列番号 6 : プライマー

配列番号 7 : プライマー

配列番号 8 : プライマー

配列番号 9 : プライマー

10 配列番号 10 : プライマー

配列番号 11 : プライマー

配列番号 12 : プライマー

配列番号 13 : プライマー

15 配列番号 14 : シュードモナス プチダ ATCC12633 由来のペプチド生成酵素のコードシーケンス

配列番号 15 : シュードモナス プチダ ATCC12633 由来のペプチド生成酵素のアミノ酸配列

配列番号 16 : シュードモナス プチダ FERM BP-8123 由来のペプチド生成酵素のコードシーケンス

20 配列番号 17 : シュードモナス プチダ FERM BP-8123 由来のペプチド生成酵素のアミノ酸配列

産業上の利用の可能性

本発明のジペプチドの製造方法により、複雑な合成方法を経ることなく、安価
25 に入手可能なL-アミノ酸エステルとL-アミノ酸を用いてジペプチドを製造することができ、医薬品素材、機能性食品等として有用なジペプチドの製造コストダウンが可能となる。また、本発明のジペプチドの製造方法によれば、様々な種

類のアミノ酸エステルおよびアミノ酸を原料として、種々のタイプのジペプチドを生成することができる。

請 求 の 範 囲

1. 下記 (A) または (B) に示すタンパク質。
 - (A) 配列表の配列番号 5 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。
 - 5 (B) 配列表の配列番号 5 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、L-アミノ酸エステルと L-アミノ酸とからジペプチドを生成する活性を有するタンパク質。
- 10 2. 下記 (C) または (D) に示すタンパク質。
 - (C) 配列表の配列番号 1 5 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。
 - (D) 配列表の配列番号 1 5 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、L-アミノ酸エステルと L-アミノ酸とからジペプチドを生成する活性を有するタンパク質。
- 15 3. 下記 (E) または (F) に示すタンパク質。
 - (E) 配列表の配列番号 1 7 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。
 - (F) 配列表の配列番号 1 7 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、L-アミノ酸エステルと L-アミノ酸とからジペプチドを生成する活性を有するタンパク質。
- 20 4. 下記 (a) または (b) に示す DNA。
 - 25 (a) 配列表の配列番号 4 に記載の塩基番号 5 7 ~ 1 2 9 5 の塩基配列からなる DNA
 - (b) 配列表の配列番号 4 に記載の塩基番号 5 7 ~ 1 2 9 5 の塩基配列からなる

DNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、L-アミノ酸エステルとL-アミノ酸とからジペプチドを生成する活性を有するタンパク質をコードするDNA

5 5. 下記(c)または(d)に示すDNA。

(c) 配列表の配列番号14に記載の塩基番号486～1496の塩基配列からなるDNA

10 (d) 配列表の配列番号14に記載の塩基番号486～1496の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、L-アミノ酸エステルとL-アミノ酸とからジペプチドを生成する活性を有するタンパク質をコードするDNA

6. 下記(e)または(f)に示すDNA。

15 (e) 配列表の配列番号16に記載の塩基番号311～1279の塩基配列からなるDNA

(f) 配列表の配列番号16に記載の塩基番号311～1279の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、L-アミノ酸エステルとL-アミノ酸とからジペプチドを生成する活性を有するタンパク質をコードするDNA

20

7. 前記ストリンジェントな条件が、1×SSC及び0.1%SDSに相当する塩濃度で60℃で洗浄が行われる条件である、請求の範囲第4項から第6項のいずれか一項に記載のDNA。

25 8. 請求の範囲第4項から第7項のいずれか一項に記載のDNAが組み込まれた組換えDNA。

9. 請求の範囲第4項から第7項のいずれか一項に記載のDNAがコードするタンパク質を発現可能に導入された形質転換細胞。

10. 請求の範囲第9項に記載の形質転換細胞を培地で培養し、培地中および／または形質転換細胞中に、L-アミノ酸エステルとL-アミノ酸とからジペプチドを生成する活性を有するタンパク質を蓄積させることを特徴とする、ジペプチド生成酵素の製造方法。

11. 請求の範囲第9項に記載の形質転換細胞が生成する、L-アミノ酸エステルとL-アミノ酸とからジペプチドを生成する活性を有するタンパク質を用いて、L-アミノ酸エステルとL-アミノ酸とからジペプチドを製造することを特徴とする、ジペプチドの製造方法。

12. 前記L-アミノ酸エステルが、L-アラニンエステル、グリシンエステル、L-バリンエステル、L-イソロイシンエステル、L-メチオニンエステル、L-フェニルアラニンエステル、L-セリンエステル、L-スレオニンエステル、L-グルタミンエステル、L-チロシンエステル、L-アルギニンエステル、L-アスパラギン酸- α -エステル、L-アスパラギン酸- β -エステル、L-ロイシンエステル、L-アスパラギン酸- γ -エステル、L-リジンエステル、L-アスパラギン酸- α 、 β -ジメチルエステル、L-グルタミン- γ -エステルからなる群より選ばれる1種または2種以上であることを特徴とする、請求の範囲第11項に記載のジペプチドの製造法。

13. 前記L-アミノ酸が、L-グルタミン、L-アスパラギン、グリシン、L-アラニン、L-ロイシン、L-メチオニン、L-プロリン、L-フェニルアラニン、L-トリプトファン、L-セリン、L-スレオニン、L-チロシン、L-リジン、L-アルギニン、L-ヒスチジンおよびL-グルタミン酸からなる群

より選ばれる１種または２種以上であることを特徴とする、請求の範囲第１１項または第１２項に記載のジペプチドの製造法。

１４． プロリンイミノペプチダーゼ活性を有するたんぱく質を、Ｌ－アミノ酸
5 エステルおよびＬ－アミノ酸に作用させ、ジペプチドを合成することを特徴とするジペプチドの製造法。

１５． 前記プロリンイミノペプチダーゼ活性を有するタンパク質が、コリネバ
クテリウム属、シュードモナス属、バチルス属のいずれかに属する微生物に由来
10 することを特徴とする、請求の範囲第１４項に記載のジペプチドの製造法。

１６． 前記プロリンイミノペプチダーゼ活性を有するタンパク質が、コリネバ
クテリウム グルタミカム、シュードモナス プチダ、バチルス コアギュラン
スのいずれかに由来することを特徴とする、請求項第１４項に記載のジペプチド
15 の製造法。

１７． 前記アミノ酸エステルが、Ｌ－アラニンエステル、グリシンエステル、
Ｌ－バリンエステル、Ｌ－イソロイシンエステル、Ｌ－メチオニンエステル、Ｌ－
フェニルアラニンエステル、Ｌ－セリンエステル、Ｌ－スレオニンエステル、
20 Ｌ－グルタミンエステル、Ｌ－チロシンエステル、Ｌ－アルギニンエステル、Ｌ－
アスパラギン酸- α -エステル、Ｌ－アスパラギン酸- β -エステル、Ｌ－ロイシ
ンエステル、Ｌ－アスパラギンエステル、Ｌ－リジンエステル、Ｌ－アスパラギ
ン酸- α 、 β -ジメチルエステル、Ｌ－グルタミン- γ -エステルからなる群よ
り選ばれる１種または２種以上であることを特徴とする、請求の範囲第１４項か
25 ら第１６項のいずれか一項に記載のペプチドの製造法。

１８． 前記Ｌ－アミノ酸が、Ｌ－グルタミン、Ｌ－アスパラギン、グリシン、

5 L-アラニン、L-ロイシン、L-メチオニン、L-プロリン、L-フェニルアラニン、L-トリプトファン、L-セリン、L-スレオニン、L-チロシン、L-リジン、L-アルギニン、L-ヒスチジンおよびL-グルタミン酸からなる群より選ばれる1種または2種以上であることを特徴とする、請求の範囲第14項から第17項のいずれか一項に記載のペプチドの製造法。

19. コリネバクテリウム属、シュードモナス属またはバチルス属に属し、アミノ酸エステルとアミノ酸とからジペプチドを生成する能力を有する微生物の培養物、該培養物より分離した微生物菌体、該微生物の菌体処理物を用いて、アミノ酸エステルとアミノ酸とからジペプチドを製造することを特徴とするジペプチドの製造方法。

20. 前記アミノ酸エステルが、L-アラニンエステル、グリシンエステル、L-バリンエステル、L-イソロイシンエステル、L-メチオニンエステル、L-フェニルアラニンエステル、L-セリンエステル、L-スレオニンエステル、L-グルタミンエステル、L-チロシンエステル、L-アルギニンエステル、L-アスパラギン酸- α -エステル、L-アスパラギン酸- β -エステル、L-ロイシンエステル、L-アスパラギンエステル、L-リジンエステル、L-アスパラギン酸- α 、 β -ジメチルエステル、L-グルタミン- γ -エステルからなる群より選ばれる1種または2種以上であることを特徴とする、請求項の範囲第19項に記載のペプチドの製造法。

21. 前記L-アミノ酸が、L-グルタミン、L-アスパラギン、グリシン、L-アラニン、L-ロイシン、L-メチオニン、L-プロリン、L-フェニルアラニン、L-トリプトファン、L-セリン、L-スレオニン、L-チロシン、L-リジン、L-アルギニン、L-ヒスチジンおよびL-グルタミン酸からなる群より選ばれる1種または2種以上であることを特徴とする、請求の範囲第19項

に記載のペプチドの製造法。

1/26

SEQUENCE LISTING

<110> 味の素株式会社 (Ajinomoto Co., Inc.)

<120> ペプチド生成酵素遺伝子、ペプチド生成酵素およびジペプチドの製造方法

<130> PAMA-14174

<150> JP Patent Application 2001-226568

<151> 2001-07-26

<150> JP Patent Application 2001-310547

<151> 2001-10-05

<160> 17

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 30

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 1

Thr Lys Thr Leu Gly Ser Leu Gln Leu Glu Glu Ile Thr Leu Thr Leu

1

5

10

15

Pro Leu Thr Glu Asp Val Ala Asp Glu Xaa Arg Xaa Glu Xaa

20

25

30

2/26

<210> 2

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:cassette PCR
primer1

<400> 2

gghwsnytbc arytbgarga ratyac

26

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:cassette PCR
primer2

<400> 3

carytbgarg aratyacbyt bacbytb

27

<210> 4

3/26

<211> 1307

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> CDS

<222> (57)..(1295)

<400> 4

ggcgagctcg ggcagtgggtg ggggtgggtgt ccacccctgc gcgtaacctg ggaagc atg 59

Met

1

act aaa aca ctt ggt tcc ctt caa ctt gaa gaa att acc ttg acg ctc 107

Thr Lys Thr Leu Gly Ser Leu Gln Leu Glu Glu Ile Thr Leu Thr Leu

5

10

15

cct ctg act gaa gat gtg gcc gat gaa cgc acc att gat gtg ttc gca 155

Pro Leu Thr Glu Asp Val Ala Asp Glu Arg Thr Ile Asp Val Phe Ala

20

25

30

cgc att gcc aca cgc gtc ggt ggg gaa gac ctt cca tat tta gta ttc 203

Arg Ile Ala Thr Arg Val Gly Gly Glu Asp Leu Pro Tyr Leu Val Phe

35

40

45

ctg cag ggt ggg cct ggc aat gaa gct cca cgt cca agc ctt aat ccc 251

Leu Gln Gly Gly Pro Gly Asn Glu Ala Pro Arg Pro Ser Leu Asn Pro

50

55

60

65

4/26

ctc aac ccc aat tgg ttg ggc gtg gcc ttg gag gaa tac cgc gtg gtc 299
 Leu Asn Pro Asn Trp Leu Gly Val Ala Leu Glu Glu Tyr Arg Val Val
 70 75 80

atg ttg gat caa cgt ggc acc ggc cgt tcc acc cca gtg ggt aat gat 347
 Met Leu Asp Gln Arg Gly Thr Gly Arg Ser Thr Pro Val Gly Asn Asp
 85 90 95

att ttg gaa aaa ccc aca gca gaa gta gtg gag tac tta tcc cac ctg 395
 Ile Leu Glu Lys Pro Thr Ala Glu Val Val Glu Tyr Leu Ser His Leu
 100 105 110

cgc gca gat ggc att gtg cga gat gct gaa gcc ctg cgt aag cat ttg 443
 Arg Ala Asp Gly Ile Val Arg Asp Ala Glu Ala Leu Arg Lys His Leu
 115 120 125

ggt gtg aat cag tgg aac ctt tta ggc cag tcc ttc gga ggt ttc acc 491
 Gly Val Asn Gln Trp Asn Leu Leu Gly Gln Ser Phe Gly Gly Phe Thr
 130 135 140 145

acc ctg cat tac ttg tcc cgg cac gcc gat tcc ttg gac aac gtg ttt 539
 Thr Leu His Tyr Leu Ser Arg His Ala Asp Ser Leu Asp Asn Val Phe
 150 155 160

att acc ggc ggt ctc agc gct att gat cgc cca gca gaa gac gtg tat 587
 Ile Thr Gly Gly Leu Ser Ala Ile Asp Arg Pro Ala Glu Asp Val Tyr
 165 170 175

gcc aac tgt tac aac cgc atg cgc cga aac tct gag gaa ttc tac cgt 635

5/26

Ala Asn Cys Tyr Asn Arg Met Arg Arg Asn Ser Glu Glu Phe Tyr Arg
 180 185 190

cgc ttc ccg caa tta cgg gaa act ttc cga ggg ttg gtt aat cgt gct 683
 Arg Phe Pro Gln Leu Arg Glu Thr Phe Arg Gly Leu Val Asn Arg Ala
 195 200 205

cgc gcc ggg gag att gtg ctt ccc acc ggc gaa gtt gtg tca gaa acc 731
 Arg Ala Gly Glu Ile Val Leu Pro Thr Gly Glu Val Val Ser Glu Thr
 210 215 220 225

agg ctg cga tcc ctt ggt cac ttg ttg ggt agc aat gac ggc tgg ttt 779
 Arg Leu Arg Ser Leu Gly His Leu Leu Gly Ser Asn Asp Gly Trp Phe
 230 235 240

gat ctg tac aac ctg ctg gaa tta gat ccc acc tcc aac gct ttt gtc 827
 Asp Leu Tyr Asn Leu Leu Glu Leu Asp Pro Thr Ser Asn Ala Phe Val
 245 250 255

cat gac ctg gca gga ctt ttg cct ttc ggc aac cgc aac cca att tat 875
 His Asp Leu Ala Gly Leu Leu Pro Phe Gly Asn Arg Asn Pro Ile Tyr
 260 265 270

tac gtg ctc cat gag tcc tct tac gcc gac ggt gtg gtg aca aat tgg 923
 Tyr Val Leu His Glu Ser Ser Tyr Ala Asp Gly Val Val Thr Asn Trp
 275 280 285

gca gca gag cgt gtg ctt cca gag gat ttc cgc gag gat cca aca ctg 971
 Ala Ala Glu Arg Val Leu Pro Glu Asp Phe Arg Glu Asp Pro Thr Leu

6/26

290	295	300	305	
ctc acc ggt gag cac gtg ttc cag gag tgg aca gac acc gtg ccg tcg				1019
Leu Thr Gly Glu His Val Phe Gln Glu Trp Thr Asp Thr Val Pro Ser				
	310	315	320	
ctc aag ccg tgg aag gac gtt gcc ctg gca ttg gct cag cag gaa tgg				1067
Leu Lys Pro Trp Lys Asp Val Ala Leu Ala Leu Ala Gln Gln Glu Trp				
	325	330	335	
ccc aag ctt tat gat gcg aag gca ttg gaa aac tca cag gcc aag ggc				1115
Pro Lys Leu Tyr Asp Ala Lys Ala Leu Glu Asn Ser Gln Ala Lys Gly				
	340	345	350	
gct gca gca gtg tat ghc aat gac gtt ttc gtc cca gtg gat tac tct				1163
Ala Ala Ala Val Tyr Xaa Asn Asp Val Phe Val Pro Val Asp Tyr Ser				
	355	360	365	
ctg gaa acc gca caa cac ctg ccc ggt gtg cag ctg ttt atc acc agc				1211
Leu Glu Thr Ala Gln His Leu Pro Gly Val Gln Leu Phe Ile Thr Ser				
	370	375	380	385
cag cat gaa cac aat gga ctt cgt gcc agc tca ggc gca gta ctg rag				1259
Gln His Glu His Asn Gly Leu Arg Ala Ser Ser Gly Ala Val Leu Xaa				
	390	395	400	
cac ctt ttc gat ctg gcc cac ggc cga gag gta cgc tgagggcccc cg				1307
His Leu Phe Asp Leu Ala His Gly Arg Glu Val Arg				
	405	410		

7/26

<210> 5

<211> 413

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 5

Met Thr Lys Thr Leu Gly Ser Leu Gln Leu Glu Glu Ile Thr Leu Thr
1 5 10 15

Leu Pro Leu Thr Glu Asp Val Ala Asp Glu Arg Thr Ile Asp Val Phe
20 25 30

Ala Arg Ile Ala Thr Arg Val Gly Gly Glu Asp Leu Pro Tyr Leu Val
35 40 45

Phe Leu Gln Gly Gly Pro Gly Asn Glu Ala Pro Arg Pro Ser Leu Asn
50 55 60

Pro Leu Asn Pro Asn Trp Leu Gly Val Ala Leu Glu Glu Tyr Arg Val
65 70 75 80

Val Met Leu Asp Gln Arg Gly Thr Gly Arg Ser Thr Pro Val Gly Asn
85 90 95

Asp Ile Leu Glu Lys Pro Thr Ala Glu Val Val Glu Tyr Leu Ser His
100 105 110

8/26

Leu Arg Ala Asp Gly Ile Val Arg Asp Ala Glu Ala Leu Arg Lys His
115 120 125

Leu Gly Val Asn Gln Trp Asn Leu Leu Gly Gln Ser Phe Gly Gly Phe
130 135 140

Thr Thr Leu His Tyr Leu Ser Arg His Ala Asp Ser Leu Asp Asn Val
145 150 155 160

Phe Ile Thr Gly Gly Leu Ser Ala Ile Asp Arg Pro Ala Glu Asp Val
165 170 175

Tyr Ala Asn Cys Tyr Asn Arg Met Arg Arg Asn Ser Glu Glu Phe Tyr
180 185 190

Arg Arg Phe Pro Gln Leu Arg Glu Thr Phe Arg Gly Leu Val Asn Arg
195 200 205

Ala Arg Ala Gly Glu Ile Val Leu Pro Thr Gly Glu Val Val Ser Glu
210 215 220

Thr Arg Leu Arg Ser Leu Gly His Leu Leu Gly Ser Asn Asp Gly Trp
225 230 235 240

Phe Asp Leu Tyr Asn Leu Leu Glu Leu Asp Pro Thr Ser Asn Ala Phe
245 250 255

Val His Asp Leu Ala Gly Leu Leu Pro Phe Gly Asn Arg Asn Pro Ile
260 265 270

9/26

Tyr Tyr Val Leu His Glu Ser Ser Tyr Ala Asp Gly Val Val Thr Asn

275

280

285

Trp Ala Ala Glu Arg Val Leu Pro Glu Asp Phe Arg Glu Asp Pro Thr

290

295

300

Leu Leu Thr Gly Glu His Val Phe Gln Glu Trp Thr Asp Thr Val Pro

305

310

315

320

Ser Leu Lys Pro Trp Lys Asp Val Ala Leu Ala Leu Ala Gln Gln Glu

325

330

335

Trp Pro Lys Leu Tyr Asp Ala Lys Ala Leu Glu Asn Ser Gln Ala Lys

340

345

350

Gly Ala Ala Ala Val Tyr Xaa Asn Asp Val Phe Val Pro Val Asp Tyr

355

360

365

Ser Leu Glu Thr Ala Gln His Leu Pro Gly Val Gln Leu Phe Ile Thr

370

375

380

Ser Gln His Glu His Asn Gly Leu Arg Ala Ser Ser Gly Ala Val Leu

385

390

395

400

Xaa His Leu Phe Asp Leu Ala His Gly Arg Glu Val Arg

405

410

10/26

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 6

ggcgagctcg ggcaagtggg ggggtgggtg

30

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 7

cgggggccct cagcgtaacct ctgggcoctg

30

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

11/26

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 8

ggcgagctca tgactaaaac acttggttcc

30

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 9

ggcggatccg gtgctcaaag cgcaa

25

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 10

ggcggatcag gtcgccgcgt tcttc

25

12/26

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 11

cacgcgctgc agcaaacccc tcat

24

<210> 12

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 12

.cccgaattct tacggagcgc gcaatg

26

<210> 13

<211> 26

<212> DNA

13/26

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 13

cggggatccc ttcattgcttc ttcagg

26

<210> 14

<211> 2078

<212> DNA

<213> Pseudomonas putida

<220>

<221> CDS

<222> (486).. (1496)

<400> 14

agatctggcg cccgtatcac ggcacccttc ggcgcggaact ggaccggttg cgcgagcagt 60

ttggctatgc cctgttgttg gatgccact cgatccgctc gcacatcccg cacctgttcg 120

atggcaagtt gccggacttc aacctgggta cttcaatgg cgccagctgc gatccggtgc 180

tggccgagcg gttgcagggc gtgtgcgccg aagcgacagg ttacagtcac gtgttgaatg 240

gtcggttcaa aggcggacac atcaccgggc actatggtga ccccgogaag catatccatg 300

14/26

cggtgcagct ggagttggcg caaagcacgt acatggagga aaccgagccg tttaacctacc 360

gggaagacct ggcgcaaccg ccgcaggtgg ttctgaagca gcttttgcaa gcgctgctgg 420

cttggggggc agaacgatac cagcgttgag tggaagaggc ggtgctcaaa gcgcaattca 480

ggttt atg atg ccc aac ggc agt caa tat cct cac acg gag tgc gca atg 530

Met Met Pro Asn Gly Ser Gln Tyr Pro His Thr Glu Cys Ala Met

1

5

10

15

cag acc ctc tac ccg cag atc aaa ccc tac gcc cgg cac gat ctg gcc 578

Gln Thr Leu Tyr Pro Gln Ile Lys Pro Tyr Ala Arg His Asp Leu Ala

20

25

30

gtg gaa gcg ccg cat gtg ctg tat gtc gat gaa agc ggc tcg ccg gaa 626

Val Glu Ala Pro His Val Leu Tyr Val Asp Glu Ser Gly Ser Pro Glu

35

40

45

ggt ctg ccc gtg gta ttc atc cac ggt ggc ccg ggt gct ggc tgc gac 674

Gly Leu Pro Val Val Phe Ile His Gly Gly Pro Gly Ala Gly Cys Asp

50

55

60

gcc cag agc cgt tgc tac ttt gac ccc aac ctg tac cgc atc atc acc 722

Ala Gln Ser Arg Cys Tyr Phe Asp Pro Asn Leu Tyr Arg Ile Ile Thr

65

70

75

ttc gac cag cgc ggc tgt ggc cgc tcc acg ccc cat gcc agc ctg gag 770

Phe Asp Gln Arg Gly Cys Gly Arg Ser Thr Pro His Ala Ser Leu Glu

80

85

90

95

15/26

aac aac aca acc tgg cac ctg gtc gag gac ctg gag cgc atc cgc gag	818
Asn Asn Thr Thr Trp His Leu Val Glu Asp Leu Glu Arg Ile Arg Glu	
100 105 110	
cac ctg ggc atc gac aaa tgg gtg ctg ttc ggc ggc tcg tgg ggt tcg	866
His Leu Gly Ile Asp Lys Trp Val Leu Phe Gly Gly Ser Trp Gly Ser	
115 120 125	
acc ctg gcc ctg gcc tac gcc cag acc cac ccc gag cgt gtg cat ggg	914
Thr Leu Ala Leu Ala Tyr Ala Gln Thr His Pro Glu Arg Val His Gly	
130 135 140	
ctg atc ctg cgg ggc atc ttc ctg tgc cgg ccg cag gag atc gag tgg	962
Leu Ile Leu Arg Gly Ile Phe Leu Cys Arg Pro Gln Glu Ile Glu Trp	
145 150 155	
ttc tac cag gag ggc gcc agc cgc ctg ttc ccc gac tac tgg cag gac	1010
Phe Tyr Gln Glu Gly Ala Ser Arg Leu Phe Pro Asp Tyr Trp Gln Asp	
160 165 170 175	
tac atc gcg ccg att ccg ccg gaa gaa cgc ggc gac ctg gtc aag gcc	1058
Tyr Ile Ala Pro Ile Pro Pro Glu Glu Arg Gly Asp Leu Val Lys Ala	
180 185 190	
ttc cac aag cgc ctc acc ggt aac gat cag att gcc cag atg cac gcc	1106
Phe His Lys Arg Leu Thr Gly Asn Asp Gln Ile Ala Gln Met His Ala	
195 200 205	

16/26

gcc aag gcg tgg tct acc tgg gag ggc cgt acc gcc acc ctg cgc ccg 1154
 Ala Lys Ala Trp Ser Thr Trp Glu Gly Arg Thr Ala Thr Leu Arg Pro
 210 215 220

aac ccg ctg gtg gtc gac cgc ttc tcc gag ccg cag cgg gcg ctg tcg 1202
 Asn Pro Leu Val Val Asp Arg Phe Ser Glu Pro Gln Arg Ala Leu Ser
 225 230 235

atc gcc cgg atc gag tgc cac tac ttc atg aac aac gcc ttc ctc gaa 1250
 Ile Ala Arg Ile Glu Cys His Tyr Phe Met Asn Asn Ala Phe Leu Glu
 240 245 250 255

ccg gac cag ttg atc cgc gac ctg ccg aag atc gcc cac ctg cca gcg 1298
 Pro Asp Gln Leu Ile Arg Asp Leu Pro Lys Ile Ala His Leu Pro Ala
 260 265 270

gtg atc gtg cac ggt cgc tat gac gtg atc tgt ccg ctg gac aac gcc 1346
 Val Ile Val His Gly Arg Tyr Asp Val Ile Cys Pro Leu Asp Asn Ala
 275 280 285

tgg gcc ctg cac cag gcc tgg ccg aac agc gaa ctg aag gtg atc cgc 1394
 Trp Ala Leu His Gln Ala Trp Pro Asn Ser Glu Leu Lys Val Ile Arg
 290 295 300

gac gcc ggc cac gcc gcg tcc gag ccg ggc atc acc gat gcc ctg gtg 1442
 Asp Ala Gly His Ala Ala Ser Glu Pro Gly Ile Thr Asp Ala Leu Val
 305 310 315

cgg gca gcc gac cag atg gcc ccg cgc ctg ctc gac ctg ccc ctg gaa 1490

17/26

Arg Ala Ala Asp Gln Met Ala Arg Arg Leu Leu Asp Leu Pro Leu Glu
320 325 330 335

gaa gca tgaggggttt gctgcagcgc gtgcgcggtg cgcgggttga agtggcgggg 1546
Glu Ala

caggtgggttg gcgcgatcga ccagggtttg ctggtgctgg tggccgtcga gcctgaagat 1606

tcccgcgagc aggccgataa gctgttgac aagctgctga actaccgtgt attcagcgat 1666

gagcacggca agatgaacct gtcgctcaag gatgtcgggg gtggtttgtt gctggtgtcg 1726

cagttcacct tggcggcgga caccgcgaac ggcatgcgtc cgagcttctc gacggcagcg 1786

ccgccggccc tcggggctga attgttcgac tatcttttgc agcaagcgaa gcgccagcat 1846

gccgacgtgg cgagcgggca attcggggca gacatgcagg tgcattctgt caatgatggc 1906

cccgtaacat ttatgttaca aatatgaggt caaaaaacc tttgtttata ggaaaacaag 1966

gggttttgta cgataaatag ttgttccagc ctgatgcgtt gtcacgcgac ctgctggata 2026

atcgcgcgct gcatggacct gcgttcgcag gttcgtttca ctctgactcg ag 2078

<210> 15

<211> 337

<212> PRT

<213> Pseudomonas putida

18/26

<400> 15

Met Met Pro Asn Gly Ser Gln Tyr Pro His Thr Glu Cys Ala Met Gln

1 5 10 15

Thr Leu Tyr Pro Gln Ile Lys Pro Tyr Ala Arg His Asp Leu Ala Val

20 25 30

Glu Ala Pro His Val Leu Tyr Val Asp Glu Ser Gly Ser Pro Glu Gly

35 40 45

Leu Pro Val Val Phe Ile His Gly Gly Pro Gly Ala Gly Cys Asp Ala

50 55 60

Gln Ser Arg Cys Tyr Phe Asp Pro Asn Leu Tyr Arg Ile Ile Thr Phe

65 70 75 80

Asp Gln Arg Gly Cys Gly Arg Ser Thr Pro His Ala Ser Leu Glu Asn

85 90 95

Asn Thr Thr Trp His Leu Val Glu Asp Leu Glu Arg Ile Arg Glu His

100 105 110

Leu Gly Ile Asp Lys Trp Val Leu Phe Gly Gly Ser Trp Gly Ser Thr

115 120 125

Leu Ala Leu Ala Tyr Ala Gln Thr His Pro Glu Arg Val His Gly Leu

130 135 140

19/26

Ile Leu Arg Gly Ile Phe Leu Cys Arg Pro Gln Glu Ile Glu Trp Phe
145 150 155 160

Tyr Gln Glu Gly Ala Ser Arg Leu Phe Pro Asp Tyr Trp Gln Asp Tyr
165 170 175

Ile Ala Pro Ile Pro Pro Glu Glu Arg Gly Asp Leu Val Lys Ala Phe
180 185 190

His Lys Arg Leu Thr Gly Asn Asp Gln Ile Ala Gln Met His Ala Ala
195 200 205

Lys Ala Trp Ser Thr Trp Glu Gly Arg Thr Ala Thr Leu Arg Pro Asn
210 215 220

Pro Leu Val Val Asp Arg Phe Ser Glu Pro Gln Arg Ala Leu Ser Ile
225 230 235 240

Ala Arg Ile Glu Cys His Tyr Phe Met Asn Asn Ala Phe Leu Glu Pro
245 250 255

Asp Gln Leu Ile Arg Asp Leu Pro Lys Ile Ala His Leu Pro Ala Val
260 265 270

Ile Val His Gly Arg Tyr Asp Val Ile Cys Pro Leu Asp Asn Ala Trp
275 280 285

Ala Leu His Gln Ala Trp Pro Asn Ser Glu Leu Lys Val Ile Arg Asp
290 295 300

20/26

Ala Gly His Ala Ala Ser Glu Pro Gly Ile Thr Asp Ala Leu Val Arg

305

310

315

320

Ala Ala Asp Gln Met Ala Arg Arg Leu Leu Asp Leu Pro Leu Glu Glu

325

330

335

Ala

<210> 16

<211> 1360

<212> DNA

<213> *Pseudomonas putida*

<220>

<221> CDS

<222> (311).. (1279)

<400> 16

ctggaagggt tcttggcgtg gggccagaag cactacacct gagtcaacga ggatcaaaat 60

gtgggagcgg gcttgtcagg tcgccgcata gccgcgatgg cggtctgtca gttcccaata 120

tgtcgactga tccgccgcta tcgcgagcaa gcccgctccc acacgtgggtg cgcgaacctt 180

cctggctgat cactgacaca ggtctaagtc ctcaaggaca tgctcattgc acaattcggg 240

21/26

tttatgatgc cagacggcaa aataatagac gtccccccag ggatggaccc gaccccttac 300

ggagcgcgca atg cag act ttg tac ccg cag atc aaa ccc tac gtc cgg 349

Met Gln Thr Leu Tyr Pro Gln Ile Lys Pro Tyr Val Arg

1

5

10

cac gat ctg gcc gtc gat gaa acc cac acg ctg tat gtc gac gaa agt 397

His Asp Leu Ala Val Asp Glu Thr His Thr Leu Tyr Val Asp Glu Ser

15

20

25

ggt tcc ccg caa ggt ttg ccc gtg gtc ttc atc cat ggc ggt ccc ggc 445

Gly Ser Pro Gln Gly Leu Pro Val Val Phe Ile His Gly Gly Pro Gly

30

35

40

45

gcc ggc tgc gat gcc aat agc cgc tgc tat ttc gat ccg aac ctg tac 493

Ala Gly Cys Asp Ala Asn Ser Arg Cys Tyr Phe Asp Pro Asn Leu Tyr

50

55

60

cgc atc gtc acc ttt gac cag cgc ggc tgc ggg cgc tcc act ccg cgg 541

Arg Ile Val Thr Phe Asp Gln Arg Gly Cys Gly Arg Ser Thr Pro Arg

65

70

75

gcc agc ctg gaa aac aac acc acc tgg gac ctg gtt gcc gac ctt gag 589

Ala Ser Leu Glu Asn Asn Thr Thr Trp Asp, Leu Val Ala Asp Leu Glu

80

85

90

cgc att cgc gag cac ctg ggg att gaa aaa tgg gtg ctg ttc ggt ggt 637

Arg Ile Arg Glu His Leu Gly Ile Glu Lys Trp Val Leu Phe Gly Gly

22/26

95	100	105	
tcc tgg ggc tcg acc ctg gcc ctg gcc tat gca caa acc cac cct gat			685
Ser Trp Gly Ser Thr Leu Ala Leu Ala Tyr Ala Gln Thr His Pro Asp			
110	115	120	125
cgc gtg ctt ggc ctg att gtg cgc ggc atc ttc ctg gcc cgc ccc cag			733
Arg Val Leu Gly Leu Ile Val Arg Gly Ile Phe Leu Ala Arg Pro Gln			
	130	135	140
gat atc cag tgg ttc tac cag gcc ggc gcg agc cgc ctg ttc ccg gac			781
Asp Ile Gln Trp Phe Tyr Gln Ala Gly Ala Ser Arg Leu Phe Pro Asp			
145	150	155	
tac tgg cag gac tac atc gcg cca atc ccg gcg gaa gag cgc cac gac			829
Tyr Trp Gln Asp Tyr Ile Ala Pro Ile Pro Ala Glu Glu Arg His Asp			
160	165	170	
atg atc agc gcc tac cac aag cgc ctg acc ggc aat gac cag atc gcc			877
Met Ile Ser Ala Tyr His Lys Arg Leu Thr Gly Asn Asp Gln Ile Ala			
175	180	185	
cag atg cat gcc gcc aag gcc tgg tcc acc tgg gaa ggc cgc atg ctc			925
Gln Met His Ala Ala Lys Ala Trp Ser Thr Trp Glu Gly Arg Met Leu			
190	195	200	205
ggc ctg tgc ccc agc ccg cag ctg atc gag cgc ttc tcc gag ccc cag			973
Gly Leu Cys Pro Ser Pro Gln Leu Ile Glu Arg Phe Ser Glu Pro Gln			
210	215	220	

23/26

cgc gcg ttg tcg att gcg cgc atc gag tgc cac tac ttc acc aat aac	1021
Arg Ala Leu Ser Ile Ala Arg Ile Glu Cys His Tyr Phe Thr Asn Asn	
225 230 235	
tcg ttc ctg gag ccc aac cag ctg att cgc gat atg cac aag atc gcc	1069
Ser Phe Leu Glu Pro Asn Gln Leu Ile Arg Asp Met His Lys Ile Ala	
240 245 250	
cat ctg ccg ggg atc atc gtg cat ggc cgc tac gat atg atc tgc ccg	1117
His Leu Pro Gly Ile Ile Val His Gly Arg Tyr Asp Met Ile Cys Pro	
255 260 265	
ctg gat aat gcc tgg gag ctg cac cag gcc tgg ccg aac agt gag ttg	1165
Leu Asp Asn Ala Trp Glu Leu His Gln Ala Trp Pro Asn Ser Glu Leu	
270 275 280 285	
cag gtg atc cgc gag gcg ggc cac gcg gcg tcc gag ccg ggc atc acc	1213
Gln Val Ile Arg Glu Ala Gly His Ala Ala Ser Glu Pro Gly Ile Thr	
290 295 300	
gat gcg ctg gtg cgt gcg gcg ggc gat atg gca cga cgc ctg ctt gat	1261
Asp Ala Leu Val Arg Ala Ala Gly Asp Met Ala Arg Arg Leu Leu Asp	
305 310 315	
ctg ccc cct gaa gaa gca tgaagggcct ttttgccnna cgggtgcgtg	1309
Leu Pro Pro Glu Glu Ala	
320	

24/26

gcgccgggtc agtggcgggc aagtgggtggg cgcgatagac cagggttgca g

1360

<210> 17

<211> 323

<212> PRT

<213> Pseudomonas putida

<400> 17

Met Gln Thr Leu Tyr Pro Gln Ile Lys Pro Tyr Val Arg His Asp Leu

1 5 10 15

Ala Val Asp Glu Thr His Thr Leu Tyr Val Asp Glu Ser Gly Ser Pro

20 25 30

Gln Gly Leu Pro Val Val Phe Ile His Gly Gly Pro Gly Ala Gly Cys

35 40 45

Asp Ala Asn Ser Arg Cys Tyr Phe Asp Pro Asn Leu Tyr Arg Ile Val

50 55 60

Thr Phe Asp Gln Arg Gly Cys Gly Arg Ser Thr Pro Arg Ala Ser Leu

65 70 75 80

Glu Asn Asn Thr Thr Trp Asp Leu Val Ala Asp Leu Glu Arg Ile Arg

85 90 95

Glu His Leu Gly Ile Glu Lys Trp Val Leu Phe Gly Gly Ser Trp Gly

100 105 110

25/26

Ser Thr Leu Ala Leu Ala Tyr Ala Gln Thr His Pro Asp Arg Val Leu
115 120 125

Gly Leu Ile Val Arg Gly Ile Phe Leu Ala Arg Pro Gln Asp Ile Gln
130 135 140

Trp Phe Tyr Gln Ala Gly Ala Ser Arg Leu Phe Pro Asp Tyr Trp Gln
145 150 155 160

Asp Tyr Ile Ala Pro Ile Pro Ala Glu Glu Arg His Asp Met Ile Ser
165 170 175

Ala Tyr His Lys Arg Leu Thr Gly Asn Asp Gln Ile Ala Gln Met His
180 185 190

Ala Ala Lys Ala Trp Ser Thr Trp Glu Gly Arg Met Leu Gly Leu Cys
195 200 205

Pro Ser Pro Gln Leu Ile Glu Arg Phe Ser Glu Pro Gln Arg Ala Leu
210 215 220

Ser Ile Ala Arg Ile Glu Cys His Tyr Phe Thr Asn Asn Ser Phe Leu
225 230 235 240

Glu Pro Asn Gln Leu Ile Arg Asp Met His Lys Ile Ala His Leu Pro
245 250 255

Gly Ile Ile Val His Gly Arg Tyr Asp Met Ile Cys Pro Leu Asp Asn

26/26

260

265

270

Ala Trp Glu Leu His Gln Ala Trp Pro Asn Ser Glu Leu Gln Val Ile
275 280 285

Arg Glu Ala Gly His Ala Ala Ser Glu Pro Gly Ile Thr Asp Ala Leu
290 295 300

Val Arg Ala Ala Gly Asp Met Ala Arg Arg Leu Leu Asp Leu Pro Pro
305 310 315 320

Glu Glu Ala

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N 9/48, C12N 15/57, C12N 1/21, C12N 1/19, C12N 5/10, C12P 21/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N 9/48, C12N 15/57, C12N 1/21, C12N 1/19, C12N 5/10, C12P 21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq, REGISTRY (STN), CA (STN),
MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	EP 1108790 A2 (KYOWA HAKKO KOGYO-KK) 2001. 06. 20 & KR 2001082585 A & JP 2002-191370 A	1, 4, 7-13
X	WO 01/00842 A2 (BASF AG) 2001. 01. 04 & AU 200054205 A & BR 200011803 A & CZ 200104658 A3	1, 4, 7-13
X	WO 94/26882 A1 (QUEST INT BZ) 1994. 11. 24 & AU 9469266 A & EP 700431 A1 & JP 9-503642 A	1, 4, 7-13

☐ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

31. 10. 02

国際調査報告の発送日

2.11.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二



4B

9281

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-13に記載された発明は、コリネバクテリウム・グルタミカム由来の配列番号5に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質に係る発明群 (請求の範囲1、4、7-13の一部)、シュードモナス・ブチダ由来の配列番号15、17に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質に係る発明群 (請求の範囲2-3、5-6、7-13の一部) の2つの発明群に区分される。また、請求の範囲14-18に記載された発明は、プロリンイミノペプチダーゼ活性を有するたんぱく質を、L-アミノ酸エステルおよびL-アミノ酸に作用させ、ジペプチドを合成するジペプチドの製造法に係る発明群であり、請求の範囲19-21に記載された発明は、コリネバクテリウム属、シュードモナス属またはバチルス属に属し、アミノ酸エステルとアミノ酸とからジペプチドを生成する能力を有する微生物の培養物、該培養物より分離した微生物菌体、該微生物の菌体処理物を用いて、アミノ酸エステルとアミノ酸とからジペプチドを製造するジペプチドの製造方法に係る発明群である。したがって、請求の範囲1-21に記載された発明は、上記4つの発明群に区分され、当該発明群が単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとは認められない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。
請求の範囲1、4、7-13のうち配列番号5に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質に係る部分

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。